

Minicircles als multifunktionelle Werkzeuge zur Erweiterung der transienten Genexpression in Säugerzelllinien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stefanie Binius
aus Wolfsburg

1. Referent:	apl. Professor Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
eingereicht am:	27.04.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	16.09.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Nehlsen, K., Broll, B., Kandimalla, R., Heinz, N., Heine, M., Binius, S., Schambach, A., Bode, J.: **Replicating Minicircles: Overcoming the Limitations of Transient and of Stable Expression Systems.** In "Minicircle and Plasmid DNA Vectors - The Future of non-viral and viral Gene-Transfer", Schleef (Ed.) Wiley-VCH Verlag, in Druck.

Tagungsbeiträge

Nehlsen, K., Broll, B., Kandimalla, R., Heine, M., Binius, S., Schambach, A., Bode, J.: **Minicircles (MCs): Overcoming the limitations of transient expression systems.** Tagungsbeitrag. PEGS (Cambridge Healthtech) Meeting "Vectors, Tags, Chaperones, and Genes" 05.10.2009, Hannover.

Nehlsen, K., Broll, B., Kandimalla, R., Heine, M., Binius, S., Schambach, A., Bode, J.: **Minicircles: Overcoming the limitations of transient expression systems.** Tagungsbeitrag. Informa "Implementing Successful Cell Line Strategies" 01.03.2010, Prag.

Jandt, U., Shao, S., Binius, S., Wirth, M., Zeng, A. P.: **Spatiotemporal modeling of transient transfection processes in mammalian cell culture.** Tagungsbeitrag. 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung 2010 21.09.2010 - 23.09.2010, Eurogress Aachen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1. Zusammenfassung.....	23
1.1 <i>Abstract</i>	24
2. Einleitung	25
2.1 Grundlagen des DFG-Projekts „EPI-TEX“	25
2.2 Der eukaryotische Zellkern.....	26
2.2.1 Organisation des eukaryotischen Zellkerns.....	26
2.2.2 Die Domänenstruktur des Chromatins.....	27
2.2.3 Grundlegende Bestandteile des Chromatins und der Kernmatrix.....	28
2.2.3.1 Histone	28
2.2.3.2 <i>Scaffold / Matrix Attachment Regions</i>	29
2.2.3.3 Weitere Bestandteile des Chromatins und der Kernmatrix	31
2.3 Transfektion von Säugerzelllinien mit nicht-viralen Vektoren	33
2.3.1 Vektorsysteme für Industrie und Gentherapie	33
2.3.2 Transfektionsmethoden für Säugerzelllinien.....	35
2.3.3 Reportersysteme	36
2.3.3.1 Gaussia Luciferase	37
2.3.3.2 <i>destabilized EGFP</i>	37
2.3.3.3 Vergleich der beiden Reporter	38
2.4 Die transiente und stabile Genexpression.....	39
2.4.1 Herstellung stabiler Säugerzelllinien.....	40
2.4.2 Die transiente Genexpression	41
2.5 Ansätze für die Erhöhung und Stabilisierung der TGE	43
2.5.1 S/MAR-Elemente	43
2.5.1.1 Das humane IFN- β M18-S/MAR-Element.....	44
2.5.1.2 Das potentielle CMV-S/MAR-Element	45

2.5.2 Minicircles	47
2.5.2.1 Das Flp/FRT-System.....	49
2.5.2.2 Arabinose-Induktion – das pBAD-System.....	50
2.6 Zielsetzung der Arbeit.....	51
3. Ergebnisse	53
3.1 Vergleich des CMV- und des M18-S/MARs mit bioinformatischen Methoden.....	53
3.1.1 Identität des CMV-S/MAR-Elements	53
3.1.2 Vergleich des S/MAR-Einflusses auf die verwendeten d2EGFP-Vektoren	56
3.2 Bestimmung der Halbwertszeit von Gaussia Luciferase	59
3.3 Optimierung des Transfektionsprotokolls von HEK293-Zellen mit Lipofectamine-2000	60
3.3.1 Erster Optimierungsschritt: DNA-Konzentrationsreihe.....	60
3.3.2 Zweiter Optimierungsschritt: Konstantes DNA:LF-2000-Verhältnis	61
3.3.3 Dritter Optimierungsschritt: Erhöhung der eingesetzten LF-2000-Menge	62
3.4 Vergleiche von Minicircles und Parentalplasmiden in der transienten Expressionsphase	65
3.4.1 Experimentelles <i>Set-Up</i>	65
3.4.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz	66
3.4.3 Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen an den Tagen 1 bis 4 p. T.	67
3.4.4 Expressionsvergleich an den Tagen 1 bis 4 p. T.	68
3.5 Anwendung des CMV-S/MAR-Elements in nicht pEpi-basierten Plasmiden.....	74
3.5.1 Verwendung des Reporters GLuc	75
3.5.2 Verwendung des Reporters d2EGFP	79
3.6 Das <i>All-In-One</i> -Konzept.....	83
3.6.1 Limitierung der Expressionsanalysen: Minicircle-Ausbeute.....	83
3.6.2 Minicircle-Herstellung mit <i>E. coli</i> MM294 und <i>E. coli</i> EL250.....	83
3.6.3 Der neuartige Vektortyp pAIO.....	84
3.6.4 Optimierung des Protokolls für die Arabinose-Induktion.....	86
3.6.5 Anwendung des <i>All-In-One</i> -Konzepts.....	90
3.7 Das <i>improved All-In-One</i> -Konzept.....	93
3.7.1 Das Prinzip des <i>improved All-In-One</i> -Konzepts.....	93
3.7.2 Nachweis der Funktionalität der <i>improved All-In-One</i> -Kassette	94

4. Diskussion	97
4.1 Bioinformatische Analyse des CMV- und des M18-S/MAR-Elements.....	97
4.1.1 Die S/MAR-Identität des potentiellen CMV-S/MAR-Elements ist bioinformatisch bestätigt	97
4.1.2 Die beiden verwendeten S/MAR-Elemente unterscheiden sich in ihrem Destabilisierungsverhalten.....	99
4.2 Mit Lipofectamine-2000 lassen sich auch geringe DNA-Mengen effizient transfizieren	100
4.3 Transiente Genexpressionsvergleiche von Minicircles und Parentalplasmiden	101
4.3.1 Die Transfektionseffizienzen von Minicircles und Parentalplasmiden sind vergleichbar.....	101
4.3.2 S/MAR-Elemente erhöhen den Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen in der transienten Phase nicht	102
4.3.3 S/MAR-Elemente können zu einer erhöhten transienten Genexpression führen, wenn sie in einem Minicircle enthalten sind.....	103
4.4 Auch in nicht pEpi-basierten Plasmiden kann das CMV-S/MAR-Element zu einer Expressionssteigerung führen	105
4.5 Mithilfe des <i>All-In-One</i> -Konzepts lässt sich die Minicircle-Ausbeute bei der Herstellung um eine Zehnerpotenz steigern.....	106
4.6 Fazit und Ausblick	108
4.6.1 Nutzung von S/MARs in der transienten Phase	108
4.6.2 Übergang von der transienten in die stabile Phase	109
4.6.3 Herstellung von Minicircles	109
5. Material	111
5.1 Verbrauchsmaterialien.....	111
5.2 Geräte	111
5.3 Chemikalien	112
5.4 Lösungen	112
5.5 Kit-Systeme	113
5.6 Nährmedien und Supplemente.....	113
5.6.1 Prokaryotische Nährmedien und Supplemente	114
5.6.2 Eukaryotische Nährmedien.....	114
5.7 Bakterienstämme.....	114
5.8 Zelllinien	115

5.9 Plasmide / Vektoren	115
5.10 Enzyme	117
5.11 Primer und Oligonukleotide	117
5.12 DNA-Marker	119
5.13 Software und Datenbanken	119
6. Methoden.....	121
6.1 Molekularbiologische Methoden	121
6.1.1 Polymerasekettenreaktion	121
6.1.1.1 Kolonie-PCR	121
6.1.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	121
6.1.2 Restriktionsverdau	122
6.1.3 Auffüllreaktion	123
6.1.4 Dephosphorylierung.....	123
6.1.5 Agarosegelelektrophorese	123
6.1.6 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel.....	124
6.1.7 DNA-Aufreinigung durch Präzipitation	124
6.1.8 Isolierung extrachromosomaler DNA aus Bakterien	124
6.1.9 Ligation	125
6.1.10 Klonierung.....	125
6.1.10.1 pEpi-Grundkonstrukte	125
6.1.10.2 Weitere pEpi-Plasmide.....	126
6.1.10.3 pCMV-GLuc-Konstrukte	127
6.1.10.4 pCMV-d2EGFP-Konstrukte.....	128
6.1.10.5 <i>All-In-One</i> -Kassette.....	129
6.1.10.6 I-SceI-Kassette.....	129
6.1.10.7 pAIO-Plasmide	130
6.1.10.8 pAIOi-CMV _{MAR} _GLuc	131
6.2 Mikrobiologische Methoden.....	132
6.2.1 Transformation.....	132
6.2.2 Herstellung eines Glycerin-Stocks	132
6.2.3 Minicircle-Produktion	132
6.2.3.1 Optimierung der Arabinose-Induktion	132
6.2.3.2 Herstellung von Minicircles	133
6.2.4 Anwendung des <i>improved All-In-One</i> -Konzepts	134

6.3 Zellbiologische Methoden.....	134
6.3.1 Auftauen von HEK293-Zellen	134
6.3.2 Kultivierung von HEK293-Zellen	134
6.3.3 Herstellung einer Kryokultur von HEK293-Zellen	134
6.3.4 Transfektion von HEK293-Zellen	135
6.3.5 Durchflusszytometrie	135
6.3.6 Luminometrische Messungen	135
6.3.6.1 Gaussia Luciferase Messungen.....	135
6.3.6.2 Bestimmung der Halbwertszeit von Gaussia Luciferase.....	136
6.4 Sonstige Methoden.....	136
6.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	136
6.4.2 Densitometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	136
 7. Literatur	 139
 8. Danksagung	 167

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Modell für die Organisationsebenen des Chromatins in Metaphase-Chromosomen	27
Abb. 2-2: SIDD-Profil des humanen Interferon- β -Gens und der stromaufwärts gelegenen Grenzregion	30
Abb. 2-3: Schematische Darstellung des Vektors pEpi-1	35
Abb. 2-4: Skizzierte, typische Expressionsdiagramme bei Verwendung der Reporter GLuc und d2EGFP	39
Abb. 2-5: SIDD-Profile des hULFN- β S/MAR-Elements SAR E und des minimalen S/MAR-Elements M18 in einem pEpi-basierten Minicircle	45
Abb. 2-6: Schematischer Aufbau des humanen Zytomegalievirus (HCMV), Stamm Ad169	46
Abb. 2-7: Schematische, nicht proportionale Darstellung der HCMV-IE1-Gen Promotor-Region	47
Abb. 2-8: Aufbau der FRT- <i>site</i> für die Rekombination mittels Flp-Rekombinase	49
Abb. 2-9: Positive und negative Regulation des pBAD-Promotors durch AraC	50
Abb. 3-1: Vergleich des CMV- und des M18-S/MAR-Elements im SIDD- und im MAR-Profil	54
Abb. 3-2: Destabilisierung der HCMV-IE1-Gen Promotor-Region	55
Abb. 3-3: SIDD-Profile der verwendeten Minicircles und Parentalplasmide mit dem Reporter d2EGFP	57
Abb. 3-4: Halbwertszeit der Gaussia Luciferase	59
Abb. 3-5: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit variablem DNA:LF-2000-Verhältnis	61
Abb. 3-6: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit konstantem DNA:LF-2000-Verhältnis	62
Abb. 3-7: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit erhöhter LF-2000-Menge ...	64
Abb. 3-8: Schematische Darstellung der für die Expressionsanalysen verwendeten Minicircles und Parentalplasmide.	65
Abb. 3-9: Transfektionseffizienz von Minicircles und Parentalplasmiden.....	67

Abb. 3-10: Anteil d2EGFP-exprimierender HEK293-Zellen (% <i>Gated</i>) zum Vergleich zwischen Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion	68
Abb. 3-11: Expressionsvergleich zwischen Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion	69
Abb. 3-12: Expressionsvergleich zwischen d2EGFP-exprimierenden Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion (Quotientenbildung)	71
Abb. 3-13: Expressionsvergleich zwischen S/MAR-haltigen und S/MAR-losen Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion	72
Abb. 3-14: Schematische Darstellung der pCMV-GLuc- und pCMVd2EGFP-basic-Plasmide mit CMV-S/MAR.....	75
Abb. 3-15: GLuc-Expressionsvergleich zwischen CMV-S/MAR-haltigen pEpi- und pCMV-basierten Vektoren	76
Abb. 3-16: Einfluss des CMV-S/MAR-Elements in pCMV-GLuc-Plasmiden auf die Expression in den ersten 72 h nach der Transfektion	77
Abb. 3-17: Einfluss der Orientierung des CMV-S/MAR-Elements stromaufwärts des CMV-Promotors auf die Expressionshöhe in der transienten Phase.....	78
Abb. 3-18: d2EGFP-Expressionsvergleich (hier % <i>Gated</i>) zwischen CMV-S/MAR-haltigen pEpi- und pCMV-basierten Vektoren.....	79
Abb. 3-19: d2EGFP-Expressionsvergleich (hier <i>X Mean</i>) zwischen CMV-S/MAR-haltigen pEpi- und pCMV-basierten Vektoren.....	80
Abb. 3-20: Einfluss des CMV-S/MAR-Elements in pCMVd2EGFP-basic-Plasmiden auf die mittlere Expression und den Anteil exprimierender Zellen drei Tage nach der Transfektion.....	82
Abb. 3-21: Beispiel für den Erfolg der Rekombination eines Parentalplasmids mittels Hitzeinduktion in <i>E. coli</i> MM294.....	83
Abb. 3-22: Schematischer Aufbau der <i>All-In-One</i> -Kassette	85
Abb. 3-23: Schematische Darstellung des pAIO-Vektortyps und Rekombination in Minicircle und Miniplasmid.....	86
Abb. 3-24: Optimierung des Protokolls der Arabinose-Induktion für pAIO-Vektoren – L-Arabinose-Konzentrationsreihe	87
Abb. 3-25: Zeitreihe der L-Arabinose-Induktion für die beiden Stämme <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' und <i>E. coli</i> TOP10 über 22,5 h	88

Abb. 3-26: Gesamter Verlust an extrachromosomaler DNA in einer 2 mL Kulturvolumen umfassenden Probe während der ersten und zweiten Arabinose-Induktion in <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'	90
Abb. 3-27: Vergleich der Minicircle-Produktion in <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' und <i>E. coli</i> EL250 ..	91
Abb. 3-28: Rekombinationseffizienz mit unterschiedlichen Bakterienstämmen	91
Abb. 3-29: Schematische Darstellung der (a) I-SceI-Kassette und der (b) <i>improved All-In-One</i> -Kassette	93
Abb. 3-30: Schematische Darstellung der Wirkung der I-SceI-Kassette im pAIOi-Vektortyp nach der Rekombination in Miniplasmid und Minicircle mittels Flpe-Rekombinase	94
Abb. 3-31: Test der Funktionalität der <i>improved All-In-One</i> -Kassette	95

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Unterschiede zwischen euchromatischen und heterochromatischen Domänen ..	28
Tab. 2-2:	Vergleich der beiden Reporter GLuc und d2EGFP	38
Tab. 2-3:	Transiente Expression rekombinanter Proteine (Maßstab mindestens 1 L)	42
Tab. 3-1:	DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektions- protokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit variablem DNA:LF-2000-Verhältnis	60
Tab. 3-2:	DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektions- protokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit konstantem DNA:LF-2000-Verhältnis	62
Tab. 3-3:	DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektions- protokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit erhöhter LF-2000-Menge ...	63
Tab. 3-4:	Übersicht über die Zellen und Transfektionsparameter der Minicircles und Parentalplasmide mit den Reportern GLuc bzw. d2EGFP	66
Tab. 3-5:	Gegenüberstellung der grundlegenden Eigenschaften dreier Minicircle-Produktionsverfahren	85
Tab. 3-6:	Übersicht über die Ansätze der L-Arabinose-Konzentrationsreihe zur Optimierung des Protokolls für die Arabinose-Induktion	87
Tab. 3-7:	Übersicht über die Ansätze der Zeitreihe mit 0,3 % L-Arabinose zur Optimierung der Arabinose-Induktion	88
Tab. 3-8:	Parameter der Minicircle-Herstellung in <i>E. coli</i> EL250 und <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'	92
Tab. 6-1:	Allgemeine Zusammensetzung eines Kolonie-PCR-Ansatzes und allgemeines Temperaturprogramm	121
Tab. 6-2:	Allgemeine Zusammensetzung eines Amplifikations-PCR-Ansatzes unter Verwendung der <i>Expand Long Template</i> (ELT) Polymerase (links) bzw. der REDTaq TM Polymerase (rechts)	122
Tab. 6-3:	Allgemeines Temperaturprofil für die Amplifikations-PCR unter Verwendung von Primern mit Adaptern	122
Tab. 6-4:	Beispielhafter Restriktionsansatz im 50 µL-Maßstab (typisch bei der Klonierung)	123
Tab. 6-5:	Typische Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	125
Tab. 6-6:	Zusammensetzung des <i>Annealing</i> -Ansatzes für die Klonierung der I-SceI- Erkennungssequenz und Temperaturprofil für das Annealing	130

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ω	Ohm
σ	<i>superhelix density</i>
∞	unendlich
293 SF	HEK293-Zellen, <i>serum-free adapted</i>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIO	<i>All-In-One</i>
AIOi	<i>improved All-In-One</i>
ARBP	<i>attachment region binding protein</i>
ARS	<i>autonomously replicating sequences</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BPV	Bovines Papillomavirus
BUR	<i>base unpairing region</i>
bzw.	beziehungsweise
c, C	Konzentration
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Adenosinmonophosphat
CAP	<i>cAMP activator protein</i>
ccc	<i>circular covalently closed</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CO ₂	Kohlendioxid
Cre	Cre-Rekombinase (<i>causes recombination</i>)
CUE	<i>core unwinding element</i>
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
d/s	stromabwärts (<i>downstream</i>)
EBNA	Epstein-Barr <i>nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	<i>extracellular domain</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELT Pol	<i>expand long template</i> Polymerase
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (Fetales Kälberserum)
Flp	Flp-Rekombinase (" <i>flippase</i> ")
FRT	<i>Flp recognition target site</i>
<i>fw</i>	<i>forward</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Schleuderziffer (Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$)
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
GOI	<i>gene of interest</i>
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HCMV	<i>Human Cytomegalovirus</i>
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEK293 (E)	<i>Human Embryonic Kidney (EBNA-1)</i>
HS-sites	<i>hypersensitive sites</i>
hu	human
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
i.A.	im Allgemeinen
i.d.R.	in der Regel
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon

IgG	Immunglobulin G
IHGSC	<i>International Human Genome Sequencing Consortium</i>
inv.	Invertiert
iPS-Zellen	<i>inducible pluripotent stem cells</i>
IR _{L/S}	<i>inverted repeat (long / short)</i>
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasenpaare
kcal	Kilokalorien
kV	Kilovolt
/	<i>liquid</i>
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LF-2000	Lipofectamine-2000
loxP	<i>locus of crossover</i> im Bakteriophagen P1
LTE-Puffer	Lysozym-Tris-EDTA-Puffer
Lys	Lysin
M	Molar
MC	Minicircle
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mLys	methyliertes Lysin
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MP	Miniplasmid
MPI-CBG	Max Planck <i>Institute of Molecular Cell Biology and Genetics</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NF1	<i>nuclear factor 1</i>
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert

NK	Negativkontrolle
NP-1	Neuropilin-1
nt	Nukleotid
n.z.	nicht zugänglich
OD ₆₀₀	optische Dichte, Wellenlänge 600 nm
o.g.	oben genannte/n
ORF	<i>open reading frame</i>
P _{CMV / SV40}	CMV- / SV40-Promotor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pckg.	Packung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>population doubling</i>
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
Pol	Polymerase
PP	Parentalplasmid
p. T.	nach der Transfektion (post Transfektion)
RBPS	<i>recombination based plasmid separation</i>
RDIF	Abteilung Genregulation und Differenzierung, HZI, Braunschweig
re	<i>reverse</i>
RG	Plasmid-Rückgrat
RMCE	<i>recombinase-mediated cassette exchange</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	<i>solid</i>
s.	siehe
SAF-A	<i>scaffold attachment factor A</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SAR	<i>scaffold attachment region</i>
SAR E	<i>scaffold attachment region E (5'IFN-β S/MAR)</i>
sc	supercoiled
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCID-X1	<i>Severe Combined Immunodeficiency-X1</i>
SEAP	<i>(human placental) secreted alkaline phosphatase</i>

<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SIDD	<i>stress induced duplex (DNA) destabilization</i>
S/MAR	<i>scaffold / matrix attachment region</i>
SMC-Effekt	S/MAR-Minicircle-Effekt
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
sog.	sogenannt
STET-Puffer	Sukrose-Triton-EDTA-Tris-Puffer
STR	<i>stirred-tank reactor</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T(A)E-Puffer	Tris-(Acetat-)EDTA-Puffer
TGE	transiente Genexpression
TNF-Rp55	Tumornektrosefaktor-Rezeptor p55
TR	Transfektionsreagenz
TR _{L/S}	<i>terminal repeat (long / short)</i>
U	<i>unit</i>
U _{L/S}	<i>unique sequence (long / short)</i>
u.a.	unter anderen
UE	<i>unpairing element</i>
Ü	Überstand
üN	über Nacht
unv.	unverdünnt
u/s	stromaufwärts (<i>upstream</i>)
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen / Volumen (Volumenprozent)
w/o	ohne (<i>without</i>)
w/v	Gewicht / Volumen (Gewichtsprozent)
YY1	Yin Yang 1
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die transiente Genexpression (TGE) ist eine industriell an Bedeutung zunehmende Methode, Proteine in kürzester Zeit in Säugerzellen zu produzieren. Ihr umfangreicher Einsatz ist jedoch durch eine zumeist rapide Abnahme der Transgenexpression eingeschränkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein transienter Ansatz unter Verwendung von Scaffold / Matrix Attachment Regions (S/MARs) und minimalen, nicht-viralen Vektorsystemen (Minicircles) im Vergleich zu pEpi-basierten Parentalplasmiden in HEK293-Zellen getestet. Die verwendeten S/MAR-Elemente waren die etablierte M18-S/MAR (Broll et al., 2010) und eine neuartige Sequenz („CMV-S/MAR“; Wirth, M., unpublished), die im Rahmen dieser Arbeit eindeutig als S/MAR identifiziert werden konnte. Die TGE wurde darüber hinaus unter Verwendung kommerziell erhältlicher Plasmide (pCMV-GLuc, New England Biolabs; pCMVd2EGFP-basic basierend auf pd2EGFP-Basic, Clontech) mit ein bzw. zwei CMV-S/MARs analysiert.

Für beide S/MAR-Elemente (M18 und CMV) wurde eine spezifische, transiente Expressionssteigerung in Minicircles gegenüber den entsprechenden Parentalplasmiden nachgewiesen (S/MAR-Minicircle- bzw. SMC-Effekt), wobei die Wirkung der beiden S/MARs unterschiedlich war: die M18-S/MAR erhöhte die TGE initial, die CMV-S/MAR stabilisierte sie über vier Tage auf einem zu Beginn niedrigeren Niveau. Darüber hinaus führte das Einführen zweier CMV-S/MAR-Elemente in pCMV-GLuc-Konstrukten zu einer relativen Steigerung der TGE um etwa dreihundert Prozent. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine S/MAR für transiente Ansätze nicht notwendigerweise mit dem transkribierten Gen fusioniert werden muss, sondern auch stromaufwärts des entsprechenden Promotors eingesetzt werden kann.

Die in dieser Arbeit ermittelte transiente Aktivität von S/MAR-Elementen ist neu und unerwartet, eröffnet jedoch erweiterte (industrielle) Anwendungsmöglichkeiten für S/MAR-basierte Minicircles. Diese dienen bisher ausschließlich der episomalen Etablierung und damit der stabilen Genexpression in Säugerzellen und können nun als universelle Vektoren sowohl für transiente als auch stabile Transfektionen potentiell eingesetzt werden. Um den erhöhten DNA-Bedarf für transiente Transfektionen auch bei der Verwendung von Minicircles decken zu können, wurde in dieser Arbeit durch Klonierung einer Arabinose-induzierbaren Flpe-Kassette in das Rückgrat von pEpi-Plasmiden der sog. pAIO-Vektortyp entwickelt und das Minicircle-Produktionsprotokoll optimiert. Dies führte zu einer mindestens zehnfachen Steigerung der Minicircle-Ausbeute im Vergleich zu konventionellen Flp-basierten Herstellungsmethoden. Die auf diese Weise produzierten Minicircles können, da sie auf dem Flp-Rekombinase-System gründen, durch minimale Veränderungen mit Flp-RMCE-Techniken kombiniert werden, was sie für die industrielle Anwendung interessant macht.

1.1 **Abstract**

Transient gene expression (TGE) is a method with increasing industrial acceptance to produce proteins in a very short period of time in mammalian cells. Wide application, however, is limited by a rapid decrease of transgene expression.

In the present work a transient approach of using scaffold / matrix attachment regions (S/MARs) and minimal, nonviral vector systems (minicircles) was tested in HEK293 cells and compared to pEpi-based parental plasmids. The S/MAR elements used here were the established M18-S/MAR (Broll et al., 2010) and a new sequence (CMV-S/MAR'; Wirth, M., unpublished), which could be clearly identified as an S/MAR in the course of the studies. In addition, TGE was analysed by using commercially available plasmids (pCMV-GLuc, New England Biolabs; pCMVd2EGFP-basic based on pd2EGFP-Basic, Clontech) with one or two CMV-S/MARs.

With the use of both S/MAR elements (M18 and CMV) a specific increase of transient gene expression was shown in minicircles, compared to corresponding parental plasmids (S/MAR-minicircle- or SMC-effect). Both S/MARs revealed differences: while the M18-S/MAR initially increased TGE, the CMV-S/MAR stabilized expression for four days on a primarily lower level. Furthermore, two CMV-S/MAR elements lead to a relative 300-percent increase of TGE in pCMV-GLuc-constructs. In this context it could also be shown that it is not necessarily required to fuse an S/MAR to the transcribed gene in transient approaches, but it can also be used upstream of the promoter.

The transient activity of S/MAR elements, which could be identified in the present work, is new and unexpected. However, it opens advanced (industrial) application for S/MAR-based minicircles. Up to now, these were exceptionally used for episomal establishment and stable gene expression in mammalian cells. Based on this new knowledge they can potentially be used as universal vectors for transient and stable transfections. To further meet the needs of increased minicircle DNA amounts for transient transfections a novel, so-called pAIO vector type was developed in this work by cloning an arabinose-inducible Flpe-cassette into the backbone of pEpi plasmids. The protocol for minicircle production was also optimized. This lead to an increase of minicircle yield of at least a factor ten, compared to conventional Flp-based methods. Minicircles that are produced in this way can be easily combined with Flp-RMCE techniques since they are based on the Flp recombinase system. Therefore they are potentially interesting for industrial application.

2. Einleitung

2.1 Grundlagen des DFG-Projekts „EPI-TEX“

Die industrielle Herstellung von Pharmaproteinen in Säugerzellen erfordert bis heute überwiegend die Verwendung stabiler Zelllinien. Der Etablierungsprozess ist jedoch langwierig und kostenintensiv (Wurm, 2004). Eine transiente Transfektion von Säugerzelllinien mit entsprechenden Expressionsvektoren und anschließende „Ernte“ des Zielproteins innerhalb weniger Tage nach der Transfektion erscheint demnach vielversprechend und sinnvoll (Wurm und Bernard, 1999; Girard et al., 2002; Liu et al., 2008). Das DFG-Projekt „EPI-TEX“ befasste sich daher mit der transienten Expressionsphase in adhärenenten HEK293-Zellen. Die gewählte Zelllinie wurde bereits in der Vergangenheit erfolgreich für die transiente Genexpression (TGE) im großen Maßstab verwendet und bietet die Möglichkeit des Wachstums in Suspensionszellkultur (Pham et al., 2003; Baldi et al., 2005).

Bisher sind transiente Expressionsansätze in der Regel durch eine schnelle, rapide Abnahme der Transgenexpression und einer dadurch bedingten unbefriedigenden Ausbeute des Zielproteins eingeschränkt (Geisse et al., 2005; Sitton et al., 2006). Die Dauer einer solchen Inkubation beläuft sich meist auf wenige Tage (Baldi et al., 2007). Für industrielle Maßstäbe wäre bereits eine Stabilisierung und / oder Erhöhung der transienten Genexpression über mehrere Tage von enormer Bedeutung. Im Rahmen des DFG-Projekts sollten neuartige, nicht-virale Vektoren entwickelt bzw. optimiert werden, um genau diese Ziele zu realisieren. Dies könnte nicht nur die Einsatzmöglichkeiten der TGE erweitern, sondern auch eine Alternative zu der Verwendung stabiler Zelllinien darstellen.

Die schnelle Abnahme der Genexpression in der transienten Phase wird zum Einen dem Silencing des Expressionsvektors zugeschrieben (Chen et al., 2004; Ochiai et al., 2006). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass in diesem Zusammenhang das Vorhandensein prokaryotischer Sequenzen im Vektor eine Hauptursache für das zelluläre Silencing darstellt (Chen et al., 2004, 2008; Riu et al., 2005; Nehlsen et al., 2006). Zum Anderen werden die Vektormoleküle über die teilungsspezifische Halbierung der Kopienzahlen hinaus aus den Zellen heraus verdünnt, sofern sie kein Retentionssignal tragen (Krysan et al., 1989; Nehlsen et al., 2006). Deshalb liegt es nahe, dass Ansätze für eine stabilisierte und erhöhte TGE diese Aspekte berücksichtigen.

2.2 Der eukaryotische Zellkern

2.2.1 Organisation des eukaryotischen Zellkerns

Eukaryoten besitzen im Gegensatz zu Prokaryoten einen Zellkern, der die Erbinformation enthält und von einer Membran umgeben ist. In linearer Form ist das eukaryotische Genom um ein Vielfaches länger als der Zellkern. Die Länge des diploiden Genoms des Menschen beträgt beispielsweise etwa 2 m. Um die gesamte Erbinformation im Zellkern zu verpacken, muss die DNA demnach stark kondensiert werden. Zudem liegt sie nicht frei vor, sondern bildet mit Proteinen und RNA einen Desoxyribonukleoprotein-Komplex. Die Organisation dieses sog. Chromatins erfolgt in mehreren Stufen (Abb. 2-1).

Die erste Verpackungsebene ist das Nukleosom (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975). Es stellt die grundlegende Organisationseinheit des Chromatins dar. Nukleosomen bestehen aus einem *core particle* (Shaw et al., 1976) und einer *linker*-DNA (Thoma et al., 1979), welche die Monomere miteinander verbindet. Die DNA des *core particle* ist 146 bp lang und in 1,65 Windungen mit dem Histon-Oktamer verbunden (Luger et al., 1997), das aus jeweils zwei Histonen H2a, H2b, H3 und H4 besteht (Kornberg, 1977). Dadurch verkürzt sich die DNA in ihrer Ausdehnung siebenfach (Nelson und Cox, 2001).

Die *linker*-DNA der Nukleosomen ist mit jeweils einem Molekül des Histons H1 besetzt (Varshavski et al., 1976; Hayashi et al., 1978). Dies erlaubt die Bildung der dem Nukleosom übergeordneten, sog. Solenoid-Struktur (Finch und Klug, 1976). Sie wird auch 30-nm-Faser genannt und führt zu einer weiteren Kondensation der DNA um das etwa Hundertfache (Nelson und Cox, 2001).

In der dritten Verpackungsebene wird die DNA durch Anheftung an einem Proteingerüst, dem sog. *Scaffold*, in Schleifen organisiert (Paulson und Laemmli, 1977). An der Ausbildung dieser Struktur sind eine Reihe von Nicht-Histon-Proteinen sowie die sog. *Scaffold / Matrix Attachment Regions* (S/MARs) der DNA beteiligt (s. Abschnitt 2.2.3).

Die höchste Stufe der Organisation ist das Chromosom, in dem ein einzelnes DNA-Molekül etwa um den Faktor 10 000 kondensiert ist (Benbow, 1992). Chromosomen lassen sich während der Mitose anfärben und sind dann unter dem Lichtmikroskop sichtbar (Belmont und Bruce, 1994).

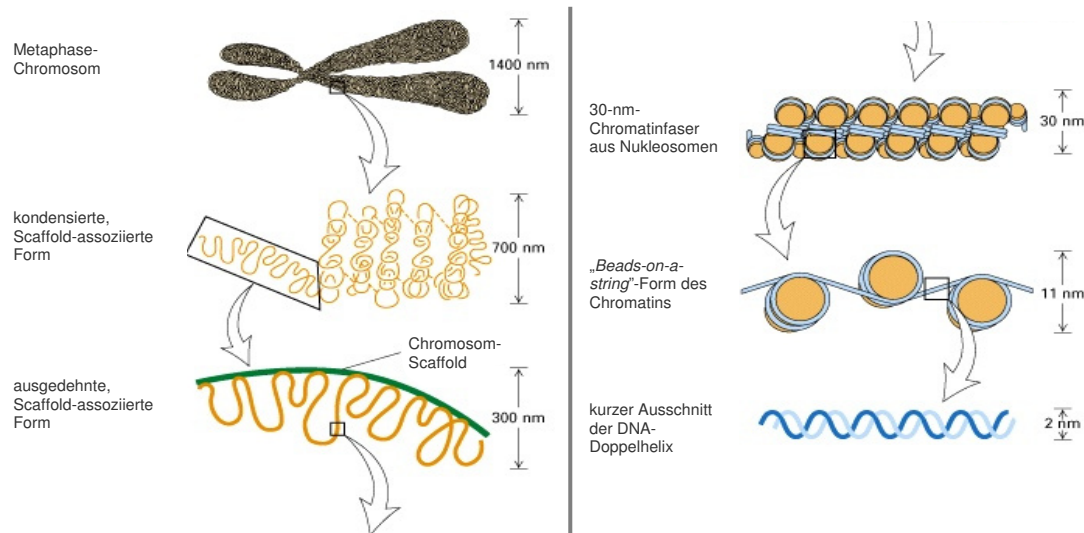


Abb. 2-1: Modell für die Organisationsebenen des Chromatins in Metaphase-Chromosomen (modifiziert nach Lodish et al., *Molecular Cell Biology*, 2001).

2.2.2 Die Domänenstruktur des Chromatins

Transkription und Replikation sind im eukaryotischen Zellkern strikt reguliert. Die Tatsache, dass beispielsweise das menschliche Genom aus etwa 20 000 bis 25 000 Genen (Stein, 2004) und drei Milliarden Basenpaaren besteht (IHGSC, 2004), verdeutlicht den Umfang dieser Aufgabe. Es gibt Gene, die ständig aktiv transkribiert werden müssen, oder solche, die in bestimmten Stufen der Zelldifferenzierung an- bzw. abgeschaltet werden müssen. Darüber hinaus muss eine Zelle, obwohl die Bedingungen in vielzelligen Organismen relativ konstant sind, unmittelbar auf äußere Umstände reagieren können (z.B. Eintritt von Pathogenen). Neben der Expression von Genen muss das gesamte Genom einmal, und nur einmal während eines Zellzyklus repliziert werden. Dies ist das Prinzip der sog. *once-per-cell-cycle replication* (Diffley, 2004; Blow und Dutta, 2005). Während des gesamten Prozesses ist die DNA eng mit Proteinen und RNA assoziiert (Nishitani und Lygerou, 2002).

Es gibt transkriptionell aktive Regionen (Euchromatin) und Regionen, die kaum (fakultatives Heterochromatin) bzw. gar nicht (konstitutives Heterochromatin) transkribiert werden (Richards und Elgin, 2002; Tab. 2-1). Um diese Regionen und den Einfluss transkriptionsfördernder und -schwächender Elemente lokal einzuschränken, ist das Chromatin in Domänen unterteilt (Nickerson et al., 1995).

Tab. 2-1: Unterschiede zwischen euchromatischen und heterochromatischen Domänen (modifiziert nach Richards und Elgin, 2002).

Merkmal	Euchromatin	Heterochromatin
Färbung / Verpackung in Interphase-DNA-Sequenz	zerstreut vorherrschend einzigartige Sequenzen	erscheint kondensiert, heteropyknotisch (differenziertes Färbeverhalten) vorherrschend repetitive Sequenzen (Satelliten; Virus-Derivate, Transposons, etc.)
Gehalt von Genen	hoch / variable Dichte	niedrige Dichte
Meiotische (reziproke) Rekombination	normale Frequenz	niedrige Frequenz
Zeitpunkt der Replikation	während der S-Phase	späte S-Phase
Chromatinstruktur	HS-sites, irreguläre Nukleosomen; für Nukleasen zugänglich	Verlust von HS-sites, reguläre Nukleosomenordnung; weniger zugänglich für Nukleasen
Aktivitätsstatus		
Euchromatische Gene	Gene induzierbar	Gene abgeschaltet (vielfältig)
Heterochromatische Gene	Gene abgeschaltet (vielfältig)	Gene induzierbar
Charakteristische Modifikationen	Histon-Hyperacetylierung	Histon-Hypoacetylierung
	Histon H3-mLys4 vorhanden	Histon H3-mLys9 vorhanden
	Cytosin-Hypomethylierung	Cytosin-Hypermethylierung

Chromatindomänen bilden eine autonome Regulationseinheit, die von Grenzelementen, den sog. *boundary elements* (BE), flankiert wird (Stief et al., 1989; Chung et al., 1993). In den meisten Fällen stellen S/MAR-Elemente BEs dar (Lipps et al., 2003; vgl. Abschnitt 2.2.3.2). Oftmals werden zudem auch Insulatoren als BE bezeichnet, da sie Gene vor externen Enhancern oder chromosomalen Positionseffekten schützen können (Recillas-Targa et al., 2002; Goetze et al., 2005). Domänen können darüber hinaus weitere regulatorische Elemente wie beispielsweise Enhancer enthalten (Cockerill und Garrard, 1986a; Cockerill et al., 1987). Das Zusammenspiel jedes dieser Elemente führt zu einer spezifischen Expression der Gene einer Domäne (Lipps et al., 2003).

2.2.3 Grundlegende Bestandteile des Chromatins und der Kernmatrix

2.2.3.1 Histone

Histonproteine sind Bestandteil des Chromatins und reich an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Es gibt fünf Hauptklassen der Histone in Eukaryoten (H1, H2a, H2b, H3,

H4), von denen insbesondere die Histone H3 und H4 evolutionär hoch konserviert sind (Nelson und Cox, 2001).

Histone erfüllen sowohl strukturelle Aufgaben (s. Abschnitt 2.2.1), als auch regulatorische Funktionen. Ihre Aminotermini ragen aus den Nukleosomen heraus (Weintraub und van Lente, 1974) und sind dadurch für posttranslationale Modifikationen zugänglich. Die Acetylierung (Phillips, 1963) und Methylierung (Murray, 1964) von Aminosäureresten in Histonen wurden bereits früh beschrieben und mit der Regulation der Transkription in Zusammenhang gebracht (Allfrey et al., 1964). Bis heute sind eine Reihe weiterer Modifikationen wie Phosphorylierung, Ribosylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung bekannt, welche die Chromatinstruktur und dessen Funktion lokal beeinflussen (Peterson und Laniel, 2004). Einen eindrucksvollen Beleg für die Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen stellen die Histon-Hypoacetylierung und Lysin-9-Methylierung des Histons H3 im Heterochromatin dar (Richards und Elgin, 2002), welche insgesamt zu einer vollständigen Repression der Transkription führen können (konstitutives Heterochromatin).

Es wird davon ausgegangen, dass die Veränderungen der Chromatinstruktur zur Rekrutierung regulatorischer Proteine führen und dadurch Gene aktiviert oder reprimiert werden können. Durch die Hyperacetylierung von Histonen werden beispielsweise Nukleosomen in eine gelockerte, offenere Form überführt (Bode et al., 1983; Bode et al., 1986; Davie, 1997), so dass die DNA für regulatorische Proteine wie Transkriptionsfaktoren einfacher zugänglich ist. Des Weiteren gibt es Proteine, die die lokale Chromatinstruktur erkennen können (s. Abschnitt 2.2.3.3).

Modifikationen der Histonschwänze wirken sich folglich direkt auf die Transkriptionsaktivität (v.a. Initiationsraten) einer Chromatindomäne aus (Nightingale et al., 1998) und sind damit für die Genregulation von größter Bedeutung.

2.2.3.2 Scaffold / Matrix Attachment Regions

Scaffold / Matrix Attachment Regions, kurz S/MARs, sind in ihrer Funktion, Position und Architektur evolutionär hoch konservierte DNA-Elemente (Cockerill und Garrard, 1986b; Ludérus et al., 1994) mit einer Länge von wenigen hundert Basenpaaren bis zu mehreren Kilobasenpaaren (Blasquez et al., 1989; Bode und Maass, 1988; Bode et al., 2006). Sie kommen ausschließlich in Eukaryoten vor (Bode et al., 1995) und besitzen eine hohe Affinität zur Kernmatrix (Cockerill und Garrard, 1986a).

Die Bindung von S/MAR-Elementen an die Kernmatrix kann konstitutiv oder fakultativ erfolgen (Bode et al., 2003). Konstitutive S/MARs sind ausgedehnt und typischerweise ein bis vier Kilobasen lang (Bode et al., 2003). Dem gegenüber sind fakultative S/MARs wesentlich kürzer und ihre Assoziation mit der Kernmatrix kann durch (Transkriptions-) Faktoren induziert werden (Bode et al., 2003).

S/MAR-Elemente haben keine bekannte Konsensussequenz, besitzen jedoch einen etwa 70-prozentigen Anteil an den Basen Adenin und Thymin (Ludérus et al., 1994). Vielmehr finden sich bei allen bisher bekannten S/MARs allerdings strukturelle Gemeinsamkeiten (Ludérus et al., 1994). S/MAR-Elemente bilden grundsätzlich eine sog. *base unpairing region* (BUR), also eine Region, die bei superhelikalem Stress zur Strangtrennung neigt (Kohwie-Shigematsu und Kohwi, 1990). Das Strangtrennungspotential wird mathematisch durch die *stress-induced (DNA) duplex destabilization*, kurz SIDD, beschrieben. Hier wird statistisch die freie Energie berechnet, die für die Trennung eines Basenpaares unter superhelikaler Spannung notwendig ist (Benham et al., 1997).

Das SIDD-Profil der humanen Interferon- β -Domäne ist in Abb. 2-2 beispielhaft dargestellt. Mit „E“ ist die Region des bekannten SAR E gekennzeichnet (Bode et al., 2006; vgl. Abschnitt 2.5.1.1).

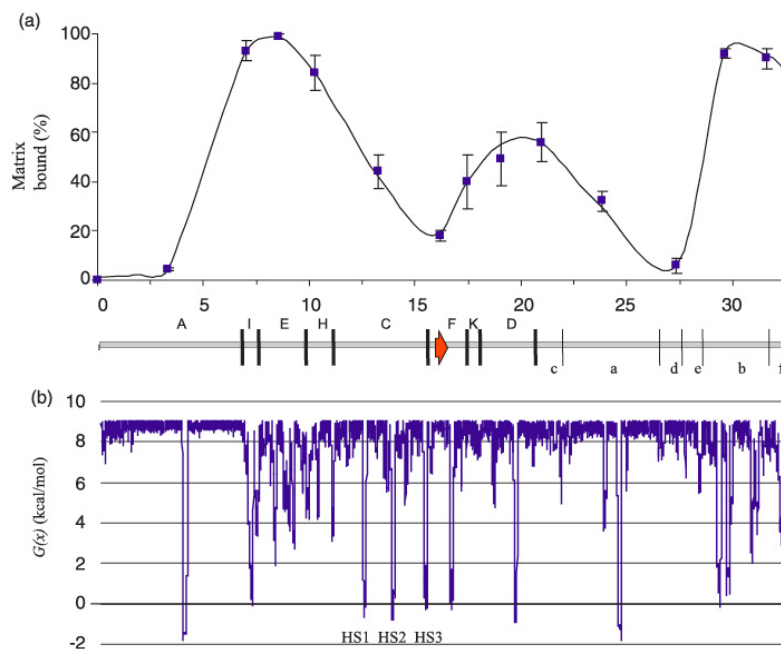


Abb. 2-2: SIDD-Profil des humanen Interferon- β -Gens und der stromaufwärts gelegenen Grenzregion (Bode et al., 2006).

(a) Bindungsstärke für EcoRI / PstI und BglII / HindIII Fragmente entlang der Interferon- β - (IFNB1-) Chromatindomäne. (b) SIDD-Profil der Region.

Das S/MAR-Element bzw. die BUR besteht aus mehreren *unpairing elements* (UE; Goetze et al., 2003), welche im SIDD-Profil anhand starker, negativer Peaks sichtbar werden. Der DNA-Abschnitt, bei dem die Strangtrennung voraussichtlich beginnt, ist durch einen besonders tiefen Peak gekennzeichnet und wird als *core unwinding element* (CUE) bezeichnet (Bode et al., 2006).

Weitere strukturelle Merkmale von S/MAR-Elementen sind die Bildung einer vergleichsweise engen kleinen Furche der DNA-Doppelhelix (Nelson et al., 1987) und eine charakteristische Krümmung der DNA (Homberger, 1989). Die Software MAR-Wiz bewertet das statistische Vorkommen solcher Motive, die die Sekundärstruktur der DNA beeinflussen (z.B. gekrümmte DNA, Topoisomerase II-Erkennungsstellen, Motive eukaryotischer Replikationsursprünge; Singh et al., 1997). Das Ergebnis ist ein mathematischer Wert, der als MAR-Potential bezeichnet wird und für die bioinformatische Bewertung potentieller S/MAR-Elemente herangezogen werden kann.

S/MARs erfüllen, ähnlich den Histonen, sowohl strukturelle als auch regulatorische Aufgaben. Die Anheftung der DNA an die Kernmatrix führt zum Einen zu der Bildung einer höher geordneten Chromatinstruktur und der Einteilung des Chromatins in Domänen (vgl. Abschnitte 2.2.1 und 2.2.2), zum Anderen verhindert sie eine freie Rotation der Domänen (Cockerill und Garrard, 1986a). Dies stellt wiederum die Grundvoraussetzung für eine als Superhelizität bezeichnete zusätzliche Verdrillung der DNA dar, die durch Einführen von Torsionsspannung entsteht (Benham, 1977). Die freie Energie $G(x)$ wurde in Abb. 2-2 beispielsweise für eine *superhelix density* mit dem Wert $\sigma = -0,055$ berechnet (Bode et al., 2006; s. auch Benham et al., 1997).

Ähnlich den S/MAR-Elementen enthalten auch eukaryotische Replikationsursprünge gewöhnlich AT-reiche Abschnitte (BURs). Bei superhelikaler Spannung erfahren sie Strangtrennung und speichern dadurch Energie, welche zu der Bildung von definierten Sekundärstrukturen in angrenzenden, sich wiederholenden Sequenzen (*repeats*) führen kann (Bode et al., 2001). Initiatorproteinkomplexe der Replikation erkennen solche Sekundärstrukturen und können so die Replikation einleiten (Bode et al., 2001). Superhelizität und die damit verbundene Strangtrennung sind damit Grundvoraussetzungen für die Replikation in Eukaryoten. S/MAR-Elemente ermöglichen in diesem Zusammenhang die Entstehung von Superhelizität und teilen darüber hinaus strukturelle und funktionelle Eigenschaften mit eukaryotischen Replikationsursprüngen (Chen et al., 2002; Nehlsen et al., 2006).

Die Eigenschaft von S/MARs, als *boundary elements* zu wirken, spielt ferner für die Regulation der Genexpression eine fundamentale Rolle, da sie Grenzen von Chromatindomänen definieren (s. Abschnitt 2.2.2).

2.2.3.3 Weitere Bestandteile des Chromatins und der Kernmatrix

Chromatin ist ein Komplex aus DNA, RNA und Proteinen. Neben den Histonen, deren wichtige Aufgaben bereits erläutert wurden, gibt es weitere, sog. Nicht-Histon-Proteine, die ebenfalls grundlegende regulatorische Aufgaben erfüllen und teilweise in großer Menge in

der Kernmatrix vorhanden sind. Die Nicht-Histon-Proteine umfassen beispielsweise Topoisomerase II (Berrios et al., 1985; Earnshaw et al., 1985), den *scaffold attachment factor A* (SAF-A; Romig et al., 1992), das *attachment region binding protein* (ARBP; von Kries et al., 1991), DNA-Polymerasen (Smith und Berezney, 1980), RNA-Polymerasen (Jackson und Cook, 1985; Roberge et al., 1988) und Transkriptionsfaktoren (Nardoza et al., 1996).

Topoisomerase II, auch unter dem Namen Sc1 bekannt (Lewis und Laemmli, 1982; Gasser et al., 1986), ist ein Hauptelement der Kernmatrix bzw. des Scaffolds (Berrios et al., 1985; Earnshaw et al., 1985) und spielt wahrscheinlich eine bedeutende Rolle für Genaktivierung und -deaktivierung (Han et al., 1985).

Offenbar kommt Topoisomerase II an der Basis von DNA-Schleifen in Chromosomen vor (Earnshaw und Heck, 1985). Zudem enthalten S/MAR-Elemente oftmals Topoisomerase II-Erkennungsstellen (Mirkovitch et al., 1987; Hanson und Ley, 1992; Zhao et al., 1998) und eine tatsächliche Enzymaktivität in S/MAR-Regionen wurde *in vitro* nachgewiesen (Udvardy et al., 1986; Sander et al., 1987). Topoisomerase II ist in die Regulation der Superhelizität von Chromatindomänen involviert (Villeponteau et al., 1984; Glikin et al., 1984; Norton et al., 1989). Supercoiling wiederum ist wichtig für eine effiziente Transkription eukaryotischer Gene (Ryoji und Worcel, 1984; Villeponteau et al., 1984), wodurch ein Zusammenhang zwischen Topoisomerase II und Genregulation hergestellt wird. Darüber hinaus übernimmt das Enzym Aufgaben bei der Segregation der Chromatiden während der Zellteilung (Holm et al., 1985).

Ein gut untersuchtes Beispiel für ein strukturerkennendes, regulatorisches Protein stellt der Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 (YY1) dar. YY1 erkennt ein DNA-Konsensus-Motiv (Shi et al., 1997) und den strukturellen Kontext der potentiellen Bindestelle (Klar et al., 2005). Das Protein interagiert mit Histon-Deacetylasen (HDACs) und Histon-Acetyltransferasen (HATs) (Weill et al., 2003) und leitet diese vermutlich in Promotorregionen, wodurch die Transkriptionsaktivität moduliert werden kann (Thomas und Seto, 1999).

YY1-Bindestellen wurden beispielsweise an den Flanken einer destabilisierten Region der humanen IFN- β Domäne identifiziert (Klar et al., 2005). Der Fund liefert Hinweise, dass sowohl das Bindemotiv, als auch das Strangtrennungspotential der betreffenden Region evolutionär konserviert sind (Klar und Bode, 2005). Bezüglich des murinen IFN- β -Promotors wurde eine duale Aktivität als Aktivator bzw. Repressor nachgewiesen (Weill et al., 2003), die sogar durch die lokale Krümmungsrichtung der DNA beeinflusst werden könnte (Shi et al., 1997). Es ist denkbar, dass YY1 in diesem Zusammenhang selbst eine DNA-Krümmung induzieren kann (Shi et al., 1997).

2.3 Transfektion von Säugerzelllinien mit nicht-viralen Vektoren

2.3.1 Vektorsysteme für Industrie und Gentherapie

Vektoren sind Vehikel, mit deren Hilfe ein Transgen in den Zellkern der Zielzellen gelangt. Sie werden sowohl in der industriellen Herstellung von Pharmaproteinen, als auch in der Gentherapie eingesetzt und sind ebenfalls für Experimente im Labormaßstab notwendig.

Je nach Fragestellung müssen Vektoren unterschiedliche Kriterien erfüllen (z.B. Menge, Reinheitsgrad, DNA-Topologie). Sie dürfen beispielsweise in der Gentherapie weder immunogen noch transformierend sein und sollten ggf. eine hohe Zellspezifität aufweisen (Lipps et al., 2003; Al-Dosari und Gao, 2009; Brenner und Okur, 2009).

Säugerzelllinien können mit viralen und nicht-viralen Vektoren transfiziert werden (Robbins und Ghivizzani, 1998; Seow und Wood, 2009). Die Expression des Transgens kann des Weiteren extrachromosomal bzw. episomal oder nach Integration erfolgen (van Craenenbroeck et al., 2000; Palazzoli et al., 2008).

Obwohl virale Vektoren den großen Vorteil hoher Transfereffizienzen aufweisen (Walther und Stein, 2000), zeigen Beispiele aus der Gentherapie auch die Notwendigkeit der Entwicklung geeigneter nicht-viraler Systeme. Im Jahr 2000 wurde von einer ersten gentherapeutischen Heilung der Erbkrankheit SCID-X1 (*severe combined immunodeficiency-X1*) durch Verwendung eines retroviralen Vektors berichtet (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Dies sollte ein Meilenstein auf dem Gebiet der Gentherapie sein. Zwei Jahre später wurde jedoch bekannt, dass ein Patient durch die Folgen von Insertionsmutagenese Leukämie entwickelt hatte (Hacein-Bey-Abina et al., 2003), und weitere Fälle folgten (Check, 2002; Marshall, 2003; Kohn et al., 2003; Cole, 2008). Zudem war bereits 1999 ein 18-jähriger Patient durch einen Gentherapieversuch mit einem Adenovirus-Vektor gestorben (Beardsley, 2000; NIH Report, 2002). Offenbar hatten virale Bestandteile zu einer außerordentlich starken Immunantwort mit darauffolgendem Multiorganversagen geführt (Beardsley, 2000). Eine Weiterentwicklung viraler Vektoren hinsichtlich Sicherheit und Verträglichkeit erwies sich also als notwendig.

Heute machen Adenovirus- und Retrovirus-basierte Vektoren in klinischen Studien für die Gentherapie trotz der genannten Rückschläge etwa 24 % bzw. 21 % aller 1644 zu testenden Vektoren aus (*The Journal of Gene Medicine*, Stand 2010). Den drittgrößten und damit ebenfalls bedeutenden Bereich stellen Ansätze mit nackter oder Plasmid-DNA dar (18 %, Stand 2010).

Auch integrierende, nicht-virale Vektoren können allerdings zu unerwünschten Reaktionen wie beispielsweise Insertionsmutagenese führen (Romano et al., 2009). Um bei der Produktion eines Pharmaproteins einen hochexprimierenden Zellklon mit definierten

Eigenschaften zu erhalten, sind zudem oftmals langwierige Screening- und Amplifikationsmethoden notwendig (vgl. Abschnitt 2.4.1). 1994 wurde von Schlake und Bode die Methode des Kassettenaustauschs vorgestellt, die die Nachteile zufällig integrierender Systeme umgehen sollte. Durch ortsspezifische Rekombination bzw. Integration wird bei diesem Verfahren die Herstellung eines hochexprimierenden Zellklons stark vereinfacht (s. Abschnitt 2.4.1).

Episomale Systeme stellen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Alternative dar. Bereits in den 1980er Jahren wurde damit begonnen, Expressionsvektoren zu entwickeln, die extrachromosomal replizieren und dadurch stabil in sich teilenden Zellen beibehalten werden können (Haase et al., 1989; Krysan et al., 1989; De Benedetti und Rhoads, 1991; Kirinaka et al., 1994). Die Natur diente hier als Vorbild: einige Säuger-spezifische Viren wie beispielsweise das bovine Papillomavirus (BPV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) replizieren mithilfe von spezifischen, viruseigenen Kofaktoren episomal (Law et al., 1981; Dyson und Farrell, 1985; van Craenenbroeck et al., 2000). Die erste Generation von Episomen setzte in Anlehnung daran auf einen viralen Replikationsursprung im Vektor und die Kodierung des entsprechenden Virusproteins (z.B. EBNA-1 für EBV oder das *large T antigen* für SV40; Lupton und Levine, 1985; Cooper et al., 1997). Das Vorhandensein viraler Proteine kann jedoch zu Zelltransformationen führen (Lipps et al., 2003), weshalb auch diese Vektorgeneration folglich keine vollkommene Sicherheit versprach. Eukaryotische Replikationsursprünge konnten und können darüber hinaus nicht ohne Weiteres alternativ verwendet werden, da deren Identifizierung und Isolierung sich schwierig gestalten (Cvetič und Walter, 2005).

Das erste Beispiel für einen nicht-viralen, episomalen Vektor, der kein Virusprotein für die Replikation benötigte, wurde 1999 von Piechaczek et al. für CHO-Zellen publiziert: pEpi-1 (Abb. 2-3). Die Gruppe klonierte statt des *large T antigens* ein S/MAR-Element (SAR E) in den Vektor, welches durch Interaktion mit zelleigenen Faktoren ganz natürlich den Kontakt mit der Replikationsmaschinerie der Zelle herstellt. Das Plasmid wird über hunderte Generationen in CHO-Zellen ohne fortlaufenden Selektionsdruck (initial notwendig) als Episom bei konstanter Kopienzahl beibehalten (Piechaczek et al., 1999). Inzwischen wurde eine Weiterentwicklung des pEpi-1 Prototyps beschrieben, die mit einer vergleichsweise reduzierten Größe und einem um 60 % verringerten CpG-Gehalt erhöhte Transgenexpressionslevel ermöglichen soll (pEPito; Haase et al., 2010).

Vielversprechende Systeme sind heute darüber hinaus die sog. Minicircles, denen im Gegensatz zu einem vollständigen Plasmid die prokaryotischen Sequenzen fehlen (Darquet et al., 1997; Nehlsen et al., in Druck; s. Abschnitt 2.5.2).

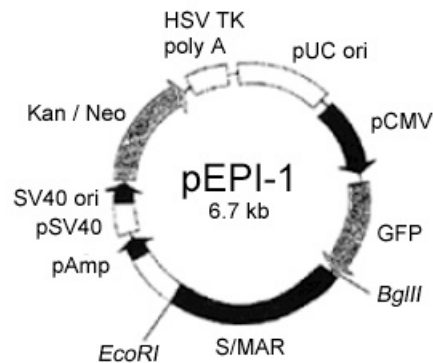


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des Vektors pEpi-1 (modifiziert nach Piechaczek et al., 1999).

Die wichtigen Elemente des Vektors sowie ausgewählte Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Die eukaryotische Expressionskassette besteht aus dem CMV-Promotor, dem GFP-Gen und der 2 kb SAR E.

2.3.2 Transfektionsmethoden für Säugerzelllinien

Pharmazeutisch relevante Proteine werden in industriell interessanten Zelllinien wie CHO und HEK293 nicht von Natur aus synthetisiert. Auch in der Gentherapie soll zumeist ein Gen exprimiert werden, das der Zelle fehlt oder beschädigt ist. Daher müssen die gewünschten Gene als sog. Transgen in die Zielzellen eingeschleust bzw. transfiziert werden. Während der Transfektion muss der Vektor die Zellmembran passieren und je nach Internalisierungsmechanismus können unterschiedliche intrazelluläre Wege angesteuert werden, bei denen sich die Menge der den Zellkern erreichenden DNA unterscheidet (Khalil et al., 2006). Der Vektor muss ggf. aus Endosomen in das Zytoplasma freigesetzt werden, die Kernmembran unbeschadet (d.h. ohne lysosomalen Abbau) erreichen und durchdringen, und schließlich im Zellkern exprimiert werden (Khalil et al., 2006). Jeder dieser Schritte kann limitierend sein und damit den Erfolg der Transfektion maßgeblich beeinflussen (Khalil et al., 2006; Akita und Harashima, 2008).

Im Laufe der Jahre wurden viele Transfektionssysteme für Säugerzelllinien entwickelt, die in erster Linie nach der Art des Vektors und des Eintritts in die Zelle unterschieden werden (Übersicht in Kim und Eberwine, 2010: Tab. 1). Einige Methoden für nicht-virale Vektoren werden in diesem Abschnitt etwas näher beschrieben.

- (a) Chemische Transfektionsmethoden: es werden Substanzen eingesetzt, die mit der DNA einen chemischen Komplex bilden, wobei zwischen kationischen Lipiden (Felgner et al., 1987; Gao und Huang, 1991), kationischen Polymeren (Boussif et al., 1995; Gao und Huang, 1996) und Kalziumphosphat (Graham und van der Eb, 1973; Ehrlich et al., 1976) unterschieden wird. Die positive Ladung dieser Reagenzien interagiert elektrostatisch mit den negativ geladenen Phosphatresten des DNA-Rückgrats (Khalil et al., 2006).

Insbesondere Liposomen werden anschließend bevorzugt durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (Friend et al., 1996), wobei es auch danach unterschiedliche Wege innerhalb der Zelle gibt (Hoekstra et al., 2007).

- (b) Physikalische Transfektionsmethoden: die Zellmembran wird durch physikalische Einflüsse überwunden. Interessant ist hier vor allem die Elektroporation (Neumann et al., 1982; Potter et al., 1984), bei der durch einen elektrischen Impuls die Struktur der Membran für einen Augenblick gelockert wird, so dass die zu transfizierende DNA in die Zelle eindringen kann (Al-Dosari et al., 2009). Die Fa. Amaxa Biosystems entwickelte darauf basierend die sog. Nucleofector Technologie (Nukleofektion; Leclerc et al., 2005), welche insbesondere für Zellen wie beispielsweise humane Monozyten geeignet ist, die sich nur erschwert transfizieren lassen (Martinet et al., 2003; Trompeter et al., 2003). Injektionen gehören ebenfalls in die Kategorie der physikalischen Transfektionsmethoden (Kim und Eberwine, 2010).

Die Auswahl eines geeigneten Transfektionssystems für eine gegebene Aufgabe ist von vielen Faktoren abhängig (z.B. Transfektionseffizienz, Stabilität der DNA, Kosten, Maßstab, Zelllinie). Für die unterschiedlichsten Expressionssysteme wurden im Laufe der Jahre Standard-Methoden beschrieben (z.B. PEI oder Kalziumphosphat für TGE in Suspensionszellkultur; Schlaeger und Christensen, 1999; Pham et al., 2006). Bei adhärenter Zellkultur im Labormaßstab werden hohe Transfektionseffizienzen von Plasmid-DNA vor allem durch die Verwendung der Lipofektion erhalten (Sells et al., 1995). Hierfür stehen eine Reihe Reagenzien unterschiedlicher Firmen zur Verfügung.

Für die Etablierung eines Vektors als Episom ist v.a. entscheidend, dass die DNA im *circular covalently closed*-Status (ccc-Status) transfiziert wird, da es ansonsten zu Integrationen kommen kann (Broll et al., 2010). Insbesondere bei S/MAR-enhaltenden Vektoren ist der superhelikale Status für deren Etablierung von enormer Bedeutung und darf daher durch das Transfektionsreagenz nicht gestört werden (Nehlsen et al., 2006). Es ist bekannt, dass die Elektroporation genau dieses Risiko birgt (Nehlsen et al., 2006; Broll et al., 2010), wodurch ihr Einsatz für die Transfektion pEpi-basierter Plasmide und vor allem Minicircles eingeschränkt ist. Hier bieten sich ‚mildere‘ Reagenzien wie Lipofectamine an (Broll et al., 2010).

2.3.3 Reportersysteme

Für die Untersuchung von neuartigen Vektoren, Transportmechanismen in der Zelle, Produktionsoptimierungen u.a. werden Reporter verwendet, die sich schnell und unkompliziert nachweisen lassen. Die Wahl des geeigneten Reportersystems geschieht

i.d.R. nach einer sorgfältigen Abwägung der Vor- und Nachteile bzw. der charakteristischen Eigenschaften eines Reporters.

Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche Reportersysteme eingesetzt, die einander ergänzen und somit eine umfassende Analyse der transienten Phase gewährleisten sollten.

2.3.3.1 Gaussia Luciferase

Luciferasen sind Enzyme, die geeignete Substrate (z.B. Luciferin) unter Emission von Photonen oxidieren. Damit gehören sie zu den biolumineszenten Reportern (Contag et al., 1997). Viele unterschiedliche Organismen wie beispielsweise Insekten und Krebstiere exprimieren Luciferase.

Anwendung als Reporter finden vor allem drei Luciferasen: *firefly* Luciferase (FLuc) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Green und McElroy, 1956; Chiu und Christopoulos, 1999), Renilla Luciferase (RLuc) aus der Koralle *Renilla reniformis* (Matthews et al., 1977; Lorenz et al., 1991, 1996) und Gaussia Luciferase (GLuc) aus dem Ruderflussskreb *Gaussia princeps* (Verhaegent und Christopoulos, 2002; Tannous et al., 2005).

Die Luciferase-Varianten FLuc und RLuc sind 550 bzw. 311 Aminosäuren (AS) lang und werden natürlicherweise intrazellulär exprimiert. Dagegen ist GLuc mit einer Länge von 185 AS vergleichsweise kurz, wird sekretiert und ist, im Gegensatz zu FLuc (Lembert und Idahl, 1995), unabhängig von ATP. Die Signalintensität, die mit humanisierter Gaussia Luciferase erreicht werden kann, ist etwa zwei Zehnerpotenzen höher als die der beiden anderen humanisierten Luciferasen (Tannous et al., 2005).

Die Unabhängigkeit von Kofaktoren sowie die hohe Signalintensität machen GLuc zu einem idealen Reporter für *Real-Time* Messungen.

2.3.3.2 destabilized EGFP

Der Reporter GFP (*green fluorescent protein*) wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und gehört aufgrund des aromatischen Systems zu der Klasse fluoreszierender Proteine (Yang et al., 1996). GFP hat eine Länge von 238 AS (Prasher et al., 1992), wird intrazellulär exprimiert und benötigt für die volle Entfaltung der Aktivität weder exogene Substrate noch Kofaktoren (Chalfie et al., 1994). Daher eignet es sich als Reporter für Genexpressionsmessungen und die Lokalisierung von Proteinen in lebenden Organismen (Chalfie et al., 1994; Marshall et al., 1995). Wildtyp-GFP weist allerdings eine geringe Sensitivität auf und akkumuliert aufgrund der relativ hohen Stabilität in der Zelle. Daher kann es für Studien, in denen der Reporter eine hohe Abbaurate aufweisen muss (z.B. als Transkriptionsmarker), nicht angewendet werden (Li et al., 1998).

Eine sensitivere GFP-Variante entstand durch Mutation und Kodon-Optimierung der DNA-Sequenz. Dieses sog. *enhanced* GFP (EGFP) ist bereits nach 16 – 24 h detektierbar (Yang et al., 1996; Zhang et al., 1996).

Um im Speziellen einen Transkriptionsreporter zu erhalten, wurde EGFP zusätzlich modifiziert. Eine Proteindomäne, die für den schnellen Abbau der *mouse ornithine decarboxylase* (MODC) verantwortlich ist (Rosenberg-Hasson et al., 1989; Murakami et al., 1992), wurde kovalent an EGFP fusioniert. Dadurch entstanden destabilisierte EGFP-Varianten, die, je nach Halbwertszeit, als d1EGFP, d2EGFP oder d4EGFP bezeichnet werden (Li et al., 1998). Das in dieser Arbeit verwendete d2EGFP weist demnach eine Halbwertszeit von etwa 2 h auf und kann als Transkriptionsmarker verwendet werden.

2.3.3.3 Vergleich der beiden Reporter

Die beiden Reporter GLuc und d2EGFP haben grundverschiedene Eigenschaften (Tab. 2-2) und sind daher für die Analyse unterschiedlicher Parameter geeignet.

Tab. 2-2: Vergleich der beiden Reporter GLuc und d2EGFP.

Kriterium	GLuc	d2EGFP
Art des Reporters	Biolumineszenz	Fluoreszenz
Messung	luminometrisch	durchflusszytometrisch
Länge	185 AS	281 AS
Expressionsart	sekretiert	intrazellulär
Stabilität	hoch	niedrig
Messergebnis	RLU / Loch	% Gated, X Mean
Hersteller des Vektors	New England Biolabs	Clontech

Gaussia Luciferase imitiert die Sekretion eines monomeren Pharmaproteins und kann Limitierungen im Sekretionspathway unterliegen bzw. diese aufzeigen. Die GLuc-Aktivität wird nach Entnahme des Zellüberstandes luminometrisch vermessen, wobei das Signal aufgrund der Sekretion zeitlich versetzt ist. Darüber hinaus wird, sofern keine Normierung vorgenommen wird, die Expression der gesamten, transfizierten Zellpopulation unabhängig von der Transfektionseffizienz und dem Vorhandensein abgestorbener Zellen bestimmt. Die Sensitivität der Messung ist sehr hoch (Tannous et al., 2005).

Dem gegenüber werden bei der Verwendung von d2EGFP als Reporter sowohl der Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen als auch die mittlere Expressionshöhe der d2EGFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Aufgrund der geringen Stabilität des Reporters wird lediglich die momentane Expression angezeigt (Li et al., 1998). Da d2EGFP nicht sekretiert wird, ist eine Signalverzögerung in dem Maße des GLuc-Reporters nicht zu berücksichtigen. Typische Expressionsdiagramme bei Verwendung des Reporters GLuc bzw. d2EGFP unterscheiden sich daher in ihrem Verlauf (Abb. 2-4). Die mittlere d2EGFP-

Expression nimmt i.d.R., ebenso wie der Anteil exprimierender Zellen, im Laufe der transienten Phase ab (Abb. 2-4 b, c), während das Maximum der gesamten GLuc-Expression eines transfizierten Lochs gewöhnlich erst nach mehr als 24 h auftritt (Abb. 2-4 a). Dies ist bei der Bewertung der Expressionsanalysen zu berücksichtigen. Die Auswertung und Ergänzung beider Datensätze kann Hinweise liefern, ob die gemessene Expression überwiegend die Folge sekretorischer oder transkriptioneller Aktivität ist.

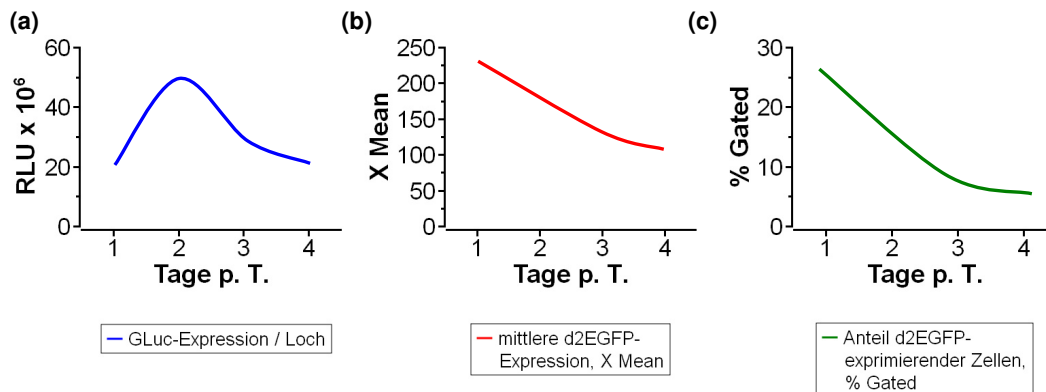


Abb. 2-4: Skizzierte, typische Expressionsdiagramme bei Verwendung der Reporter GLuc und d2EGFP.

Die Diagramme basieren auf einer Zusammenfassung von Beobachtungen aus dieser Arbeit. **(a)** Gesamte GLuc-Expression eines transfizierten Lochs, **(b)** mittlere d2EGFP-Expression X Mean von d2EGFP-positiven Zellen, **(c)** Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen % Gated an der Gesamtheit der vermessenen Zellen.

2.4 Die transiente und stabile Genexpression

Bei der Beschreibung der Transgenexpression in eukaryotischen Zellen wird zwischen der transienten und der stabilen Expression (Etablierung) unterschieden. Die vorhergehende transiente Expression stellt eine notwendige Voraussetzung für die Etablierung des Transgens dar (Condreay et al., 1999).

Im Zustand der stabilen Expression wird das Transgen auf einem konstanten Level über eine große Anzahl von Zellteilungen, sog. *population doublings* (PDs) exprimiert. Um einen einheitlichen Phänotyp zu präsentieren, sollte für den etablierten Zustand möglichst ein Einzelklon vorliegen.

Jeder Zustand, der diese Kriterien nicht erfüllt, sollte demnach unter dem Begriff ‚transient‘ zusammengefasst werden können. Die Abgrenzung ist allerdings nicht trivial. Als ‚transiente Phase‘ wird i.A. der Zeitraum von ein bis zwei Wochen nach der Transfektion bezeichnet, in dem die Expression deutlich und rapide abnimmt (Geisse et al., 2005; Sitton et al., 2006). Bis das Transgen gemäß Definition allerdings etabliert ist, können je nach System viele PDs nötig sein und somit mehr als zwei Wochen vergehen. Um die Schwierigkeit der Abgrenzung beider Phasen zu verdeutlichen, könnte der Term ‚Übergangsphase‘ verwendet werden.

2.4.1 Herstellung stabiler Säugerezelllinien

Stabile Säugerezelllinien werden für die industrielle Produktion rekombinanter Pharmaproteine in großem Maße verwendet, da sie kontinuierlich hohe Proteinausbeuten gewährleisten (Baldi et al., 2007). Die Herstellung einer solchen Zelllinie ist indes langwierig und kostenintensiv, weil Klone mit den gewünschten Eigenschaften bezüglich Kopienzahl, Expressionshöhe und ggf. Ort der Integration identifiziert werden müssen.

Da bei der Produktion rekombinanter Pharmaproteine aus Sicherheitsaspekten auf die Verwendung viraler Vektoren verzichtet werden muss, werden an dieser Stelle lediglich nicht-virale Systeme zur Herstellung stabiler Zelllinien vorgestellt. Eine Übersicht viraler Systeme bieten beispielsweise Osten et al. (2007).

Die Integration des Transgens in das Genom der Zielzellen ist eine Möglichkeit, stabile Säugerezelllinien herzustellen. Es gibt die Methode der zufälligen, sog. *random integration* (Hackett et al., 2007), bei der das *gene of interest* (GOI) an einer zufälligen, nicht-vorhersagbaren Stelle in das Genom integriert wird. Dies führt zwangsläufig dazu, dass aufwändige Screenings durchgeführt werden müssen, um einen hochexprimierenden Zellklon zu erhalten (Qiao et al., 2009). Zumeist sind darüber hinaus Amplifikationsmethoden notwendig, um die Kopienzahl des Zielgens zu vervielfachen (Wurm, 2004). Am Ende steht zwar ein einzelner Masterklon mit definierten Eigenschaften und großem Produktionspotential, der Weg dorthin ist jedoch mühsam.

Als Alternative bietet sich die zielgerichtete, sog. *targeted integration* an. Die Methode hat den Vorteil, dass bereits vor der Integration des GOI ein genomischer Locus ausgewählt werden kann, der konstitutiv, stabil und mit hoher Rate exprimiert wird (Oumard et al., 2006). Der zu erwartende Klon hat vorhersagbare Eigenschaften (Oumard et al., 2006), wodurch das Screening nach Hochexprimierern signifikant vereinfacht bzw. zeitlich verkürzt wird. Die zielgerichtete Integration kann durch homologe oder ortsspezifische Rekombination erfolgen (Rubnitz und Subramani, 1985; Bollag et al., 1989; Schlake und Bode, 1994). Ersteres wird erfolgreich in Stammzellen angewendet, ist für die meisten biotechnologisch relevanten Zelllinien jedoch zu ineffizient (Oumard et al., 2006). Ortsspezifische (*site-specific*) Rekombination eignet sich in diesen Fällen besser (Oumard et al., 2006). Im einfachsten Fall sind je eine *target site* im Genom und eine im Vektor enthalten, so dass die gesamte Vektor-DNA integriert. Dadurch werden jedoch prokaryotische Sequenzen, die für die Herstellung der DNA notwendig sind, kointegriert und können zu unerwünschten Effekten wie einer Heterochromatisierung und infolgedessen zu einer Abschaltung der Genexpression führen (Riu et al., 2005). Aus diesem Grund wurde der Kassettenaustausch bzw. das RMCE-Verfahren (*recombinase-mediated cassette exchange*) entwickelt (Schlake und Bode, 1994), bei dem eine Expressionskassette, mindestens bestehend aus dem GOI und zwei

(heterospezifischen) *target sites*, gegen eine von denselben *sites* flankierte, genomische Sequenz ausgetauscht wird (Turan et al., 2011). Als ortsspezifische Rekombinasen bieten sich die gut untersuchten Enzyme Flp, Cre und Φ C31 an (Birling et al., 2009; s. Abschnitt 2.5.2.1). Der Vorteil dieser Methode ist offensichtlich: lediglich die DNA-Sequenz, die für die Expression des Zielgens tatsächlich benötigt wird, wird in das Genom integriert. Darüber hinaus ist die Reaktion im Prinzip irreversibel, da der sog. *exchange vector*, also der GOI-enthaltende Austauschvektor im großen Überschuss verabreicht wird (Oumard et al., 2006). Es wurde herausgefunden, dass S/MAR-Flanken das GOI vor Heterochromatisierung schützen und somit die Expression erhöhen und stabilisieren können (Goetze et al., 2005). Eine Art Durchbruch gelang kürzlich Qiao et al. (2009) mit der Entwicklung eines RMCE-Systems, das innerhalb von zwei Monaten einen hochexprimierenden, kompetenten Masterklon hervorbringt. Dies dürfte insbesondere für industrielle Zwecke hochinteressant sein.

Seit der Beschreibung des ersten autonom replizierenden Episoms pEpi-1, das nicht auf virale Kofaktoren angewiesen ist (Piechaczek et al., 1999), werden neben den integrierenden Systemen auch episomale Vektoren zunehmend interessant für Industrie und Gentherapie. Sie erlauben die stabile Genexpression ohne langwierige Suche nach einem geeigneten Integrationsort im Genom und können dadurch ebenfalls zu einer zeitlichen Verkürzung der Herstellung stabiler Zelllinien beitragen (vgl. Abschnitte 2.3.1 und 2.5.2).

2.4.2 Die transiente Genexpression

Die transiente Genexpression ist vorwiegend für die (parallele) Untersuchung von Vorstufen oder unterschiedlichen Varianten eines Proteins im *High-Throughput*-Verfahren bedeutend (Durocher et al., 2002; Cho et al., 2003; Baldi et al., 2007) und stellt eine an Beliebtheit zunehmende Alternative zur Verwendung stabiler Zelllinien dar (Liu et al., 2008). In Pharmaunternehmen werden für Arzneimittelforschungsprogramme im steigenden Maße TGE-Systeme bis zu einem Maßstab von 100 L verwendet (Baldi et al., 2007). Einige bisher beschriebene, ausgewählte TGE-Beispiele sind Tab. 2-3 zu entnehmen.

Der Erfolg der transienten Genexpression ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, zu denen die Zelllinie, der Expressionsvektor, das Transfektionsvehikel und das Kulturmedium zählen (Durocher et al., 2002). Die Parameter müssen für jedes Expressionssystem hinsichtlich des Produktionsziels optimiert werden, wobei der Einfluss eines einzelnen Faktors enorm sein kann, wie das folgende Beispiel verdeutlicht: Bentley et al. (1998) haben lediglich durch unterschiedliche Kombinationen schwerer und leichter Antikörperketten bei der Antikörperproduktion bis zu 200-fach unterschiedliche, transiente Expressionslevel in CHO-Zellen erhalten.

Tab. 2-3: Transiente Expression rekombinanter Proteine (Maßstab mindestens 1 L).

(modifiziert nach Baldi et al., 2007). Beispiele bereits beschriebener, transienter Expressionssysteme sind aufgeführt. Abkürzungen: n.d. nicht detektiert, n.z. nicht zugänglich, TR Transfektionsreagenz.

Produkt	Zelllinie	TR	Serum	Maßstab [L]	Kultursystem	Titer _{max} [mg · L ⁻¹]	Ausbeute _{max} [mg]
TNF-Rp55	HEK293E	PEI	nein	2	Erlenmeyer	0,55	n.d.
hu-IgG	HEK293E	CaPi	ja	110	150 L STR	7,7	500
Tie-2 ED	293-SFE	PEI	nein	14	STR	n.d.	33
NP-1	293-SFE	PEI	nein	10	STR	n.d.	35
hu-IgG	HEK293E	PEI	nein	4	Biotainer™	4,25	17
SEAP	HEK293E	PEI	ja	1	1 L STR	25	n.d.
B2-CD1d	HEK293E	PEI	nein	2	Schüttelkolben	n.z.	24
hu-IgG	CHO DG44	PEI	nein	13	20 L STR	6	n.d.
hu-IgG	CHO DG44	PEI	nein	80	110 L STR	22	n.d.

Das bei der transienten Transfektion erhaltene Klongemisch besteht, sofern die Transfektionseffizienz geringer als 100 % ist, aus Zellen, welche das Transgen exprimieren, und solchen, die keine Expression aufweisen. Darüber hinaus kann auch immer ein gewisser Anteil abgestorbener Zellen im Gemisch enthalten sein. Die Wahl der Transfektionsmethode beeinflusst diese Verteilung maßgeblich und sollte daher sorgfältig bedacht werden (vgl. Abschnitt 2.3.2).

Neben der Art der Transfektion wirken sich Topologie und Größe der DNA auf die Transfektionseffizienz aus (Weintraub et al., 1986; Buttrick et al., 1992; Darquet et al., 1999). Zirkuläre DNA-Moleküle sind i.A. stabiler gegenüber Nuklease-Abbau als lineare Moleküle. Die höchste Effektivität wird bei der Transfektion gewöhnlich unter Verwendung von supercoiled DNA-Molekülen erreicht (Weintraub et al., 1986), welche durch die inhärente Superhelizität zudem am ehesten dem topologischen Zustand des Genoms entsprechen. Darüber hinaus sollte die verwendete DNA möglichst frei von bakteriellen Rückständen sein, da diese in der eukaryotischen Zelle zu unerwünschten Nebeneffekten führen könnten (z.B. Endotoxine; Ritzén et al., 2007).

Die Zellkernmembran stellt zweifelsohne eine nahezu unüberwindbare Barriere für Plasmide gewöhnlicher Größe (~ 10 kb) dar (Zabner et al., 1995; Escriou et al., 1998), und ihre Durchquerung ist ein wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche TGE. Es besteht daher u.a. die umstrittene Überlegung, der Zellzyklus könne die Transfektionseffizienz beeinflussen (Grosjean et al., 2002). Demnach sollte eine möglichst hohe Kopienzahl des Transgens im Kern erreicht werden, wenn die Transfektion kurz vor oder während der temporären Auflösung der Kernmembran in der G2/M-Phase erfolgt. Diese These ist bisher allerdings weder hinreichend belegt noch widerlegt (Pollard et al., 1998). Zudem besteht zwischen der Expression und der Kernkopienzahl offenbar kein durchweg linearer Zusammenhang (Tachibana et al., 2002; Bode et al., 2003), so dass andere Faktoren eine übergeordnete

Rolle spielen könnten. Folglich muss für jedes Expressionssystem der Einfluss des Zellzyklus auf die Transfektionseffizienz gesondert ermittelt werden.

Auf Kernebene gewinnen für die TGE weitere Faktoren an Einfluss, die ebenfalls nicht vernachlässigt werden dürfen. Der Expressionsvektor liegt nach der Transfektion und Durchquerung der Zellkernmembran (zunächst) extrachromosomal vor und enthält i.d.R. zellfremde DNA-Sequenzen. Die DNA ist daher anfällig für Silencing-Mechanismen. Neben dem aktiven Silencing wie der Methylierung (Doerfler et al., 1989; Chomet, 1991), stören auch passive Mechanismen wie der schlichte Verlust von Transgenkopien durch Zellteilung den Erfolg der Produktion. Hinsichtlich der Optimierung der TGE muss daher auch bei der Anfälligkeit für Silencing angesetzt werden. Im folgenden Abschnitt 2.5 werden zwei Ansätze vorgestellt, die zu einer Verminderung des aktiven und passiven Silencing beitragen sollen und damit die Ausbeute einer TGE erhöhen könnten.

2.5 Ansätze für die Erhöhung und Stabilisierung der TGE

2.5.1 S/MAR-Elemente

In den 1980er Jahren wurden in Hefegenomen die sog. *autonomously replicating sequences* (ARS) entdeckt, welche eine autonome Replikation von ARS-Plasmiden in Hefezellen erlauben (Celniker und Campbell, 1982; Huberman et al., 1988). Diese neuartigen Elemente zeigten erstaunliche strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu S/MAR-Elementen (Amati und Gasser, 1988, 1990). Genomische ARS aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* sind sogar im eigentlichen Sinne S/MAR-Elemente (Amati et al., 1990). Es konnte folglich erwartet werden, dass ‚S/MAR-Vektoren‘ in Säugerzellen ebenso autonom replizieren sollten wie ARS-Vektoren in Hefen.

Der Prototypvektor pEpi-1 wurde entsprechend erfolgreich als ‚S/MAR-Vektor‘ entwickelt (vgl. Abschnitt 2.3.1) und stellt streng genommen eine ARS dar. Für die Etablierung des pEpi-1-Vektors ist lediglich ein initialer Selektionsdruck notwendig. Anschließend wird das Episom ebenso wie das gesamte Genom einmal je Zellzyklus repliziert, wodurch die Kopienzahl konstant bleibt (< 20 ; Piechaczek et al., 1999). Voraussetzung für die Funktionalität dieses Systems ist, dass das S/MAR-Element mit einer stromaufwärts gelegenen Transkriptionseinheit verbunden ist (Stehle et al., 2003; Jenke et al., 2004). Die Deletion des Transgens führt dabei ebenso zu einem Verlust der episomalen Replikationsfähigkeit des Vektors wie die Klonierung einer zusätzlichen Polydenylierungsstelle zwischen Gen und S/MAR (Stehle et al., 2003). Eine aktive Transkription in die S/MAR hinein ist also eine wichtige Voraussetzung für die episomale Etablierung (Stehle et al., 2003), da sie die für die Replikation notwendige Strangöffnung

ermöglicht. Zwar hat die S/MAR auf dem Expressionsplasmid ein erhöhtes Strangtrennungspotential, jedoch führt erst superhelikaler Stress, ausgelöst durch den ccc-Status des Plasmids und durch fortlaufende Transkription, zu der tatsächlichen Öffnung (Mielke et al., 1990). Das S/MAR-Element stellt im Folgenden nicht den Replikationsursprung selbst dar, sondern schafft lediglich die Voraussetzungen für eine Replikation, die anschließend prinzipiell an einer beliebigen Stelle von pEpi-1 in nicht-transkribierten Regionen starten kann (Bode et al., 2001; Schaarschmidt et al., 2004).

Es bleibt festzuhalten, dass ein S/MAR-Element alle nötigen Eigenschaften mitbringt, um ein Plasmid wie pEpi-1 als Episom in Säugerzellen zu etablieren. Dies ist allerdings nicht der einzige Vorteil der Verwendung von S/MARs, wie beispielsweise der Einsatz bei RMCE-Systemen zeigt. S/MARs bilden in ihrer Funktion als *bordering element* Domänengrenzen, wodurch eine Inaktivierung des (Trans-) Gens durch flankierendes Heterochromatin verhindert wird (Stief et al., 1989; Phi-Van et al., 1990). Die starke Interaktion mit Matrixproteinen wie SAF-A (Jenke et al., 2002) und Transkriptionsfaktoren (z.B. YY1; Klar et al., 2005) führt sowohl zur Retention und authentischen Segregation eines Episoms als auch zu einer erhöhten Transkriptionsinitiation der Expressionskassette (Baiker et al., 2000; Bode et al., 2000; Jenke et al., 2002). Sowohl in stabilen Zellexpressionssystemen als auch in transgenen Organismen wurde gezeigt, dass S/MARs die Genexpression erhöhen können (Stief et al., 1989; Phi-Van und Strätling, 1996; Namciu et al., 1998).

In transienten Ansätzen könnten S/MAR-Elemente aufgrund der genannten Eigenschaften ebenfalls vielversprechende Werkzeuge darstellen, obwohl in der Vergangenheit sogar von negativen Einflüssen auf die TGE berichtet wurde (Klehr et al., 1991; Schübeler et al., 1996). Für transiente Proteinproduktionen werden i.A. sehr starke virale Promotoren verwendet (z.B. HCMV; Baldi et al., 2007), die als zellfremde Sequenzen zum Silencing neigen (Löser et al., 1998; Doerfler, 2006). S/MAR-Elemente könnten hier bereits in der transienten Phase die Promotormethylierung verringern und somit zu einer erhöhten transienten Genexpression beitragen. Die Interaktion mit der Kernmatrix sowie die Rekrutierung transkriptionsfördernder Proteine könnten zudem bereits in der transienten Phase einen positiven Einfluss auf die Expressionshöhe des Transgens haben. Es ist auch denkbar, dass SAF-A bereits transient eine Art ‚Retentionswirkung‘ auf die S/MAR-Vektoren ausübt und so die Verdünnung während der Zellteilung verringert.

2.5.1.1 Das humane IFN- β M18-S/MAR-Element

Interferone gehören zu der Familie der Zytokine und werden infolge stimulierender Substanzen wie beispielsweise Viren in tierischen Zellen exprimiert (Friedman, 1977; Hiscott et al., 1989). Es gibt drei Gruppen der Interferone: alpha, beta und gamma (Trent et al., 1982).

Die Interferon- β - (IFN- β , IFNB1) Domäne kodiert das 166 AS lange β - bzw. Fibroblasten-Interferon (Derynck et al., 1980; Trent et al., 1982). In der humanen IFNB1-Domäne (vgl. Abb. 2-2) konnten zwei starke S/MAR-Elemente identifiziert werden, die die Transkriptionseinheit abgrenzen: die 7 kb-*upstream* und die 5 kb-*downstream* S/MAR (Bode et al., 2006). Innerhalb des 5'-Bereiches wurde daraufhin ein Subfragment (2 kb) mit besonders hoher Matrix-Bindeaffinität näher charakterisiert, das im Folgenden die Bezeichnungen Fragment I, SAR E oder 5'-IFN- β S/MAR erhielt und für die Konstruktion von pEpi-1 verwendet wurde (Mielke et al., 1990; Bode et al., 1992; Piechaczek et al., 1999). Es zeichnet sich u.a. durch DNase I-Hypersensitivität (Bode et al., 2000), eine starke Kernmatrix-Bindung (Mielke et al., 1990) und eine erhöhte Transgenexpression bei stabiler Transfektion (Mielke et al., 1990; Klehr et al., 1991) aus.

Broll et al. (2010) verwendeten einen pEpi-basierten Minicircle mit SAR E für die Herstellung stabiler Zelllinien. Im Verlauf der Experimente erfuhr die S/MAR durch spontane Deletion (*in vivo* Evolution) eine Größenreduktion von 2 kb auf 733 bp (Abb. 2-5), wodurch sowohl die Stabilität als auch die Klonierungskapazität des Minicircles erhöht wurde. Das resultierende, sog. M18-S/MAR-Element wurde in dieser Arbeit verwendet.

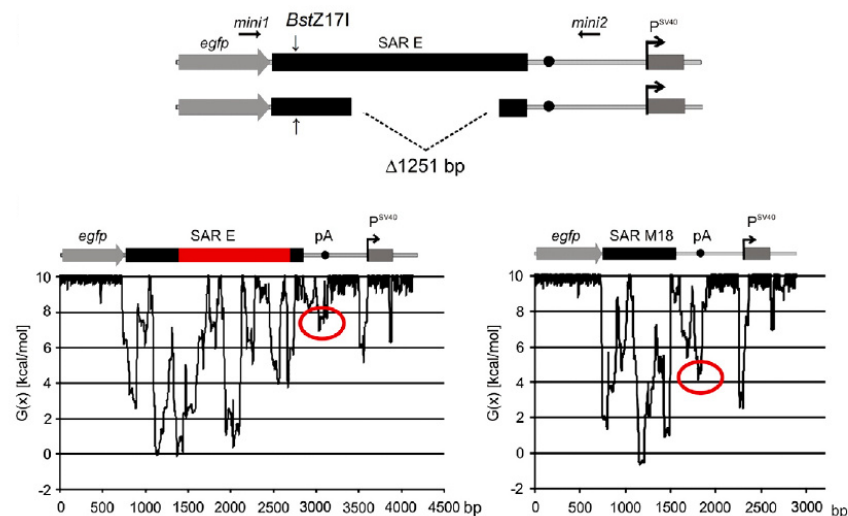


Abb. 2-5: SIDD-Profil des huIFN- β S/MAR-Elements SAR E und des minimalen S/MAR-Elements M18 in einem pEpi-basierten Minicircle (Broll et al., 2010).

Die Deletion innerhalb der SAR E, die zur Bildung der SAR M18 führte, ist schematisch angezeigt. Abkürzungen: egfp enhanced green fluorescent protein, mini Primerbezeichnung, pA Polyadenylierungsstelle, p^{SV40} SV40-Promotor, SAR scaffold attachment region.

2.5.1.2 Das potentielle CMV-S/MAR-Element

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur Gruppe der Herpesviren und besitzt eine lineare, doppelsträngige DNA von etwa 235 kb Größe (Hennighausen und Fleckenstein,

1986). Das HCMV-Genom besteht aus zwei sog. *unique* Sequenzen unterschiedlicher Länge (U_L und U_S), die jeweils von invertierten Sequenzwiederholungen (sog. *inverted repeats*) flankiert sind (Westrate et al., 1980; Ebeling et al., 1983; Abb. 2-6).

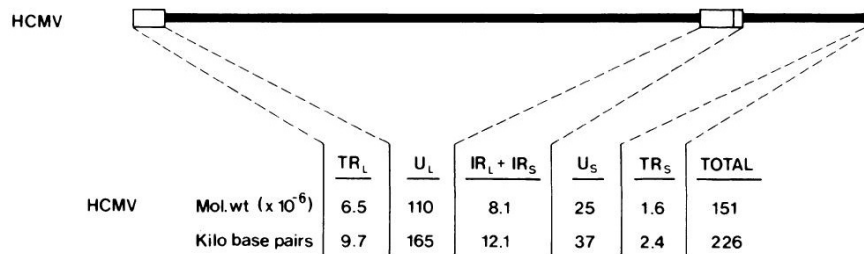


Abb. 2-6: Schematischer Aufbau des humanen Zytomegalievirus (HCMV), Stamm Ad169 (modifiziert nach Ebeling et al., 1983).

Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom des HCMV besitzt eine Größe von etwa 235 kb und besteht aus den zwei Elementen U_L (long unique sequence) und U_S (short unique sequence), die jeweils von invertierten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) flankiert werden.

Direkt nach der Infektion werden die sog. *immediate early* (IE) Gene unabhängig von einer vorhergehenden Synthese viraler Proteine exprimiert (Stinski et al., 1983). Virale IE-RNAs wurden dem U_L -Bereich des HCMV-Genoms zugeordnet (Demarchi, 1981; Wathen und Stinski, 1982). Die IE-Proteine erhöhen die transkriptionelle Aktivität des Chromatins und verursachen Veränderungen in der Chromatinstruktur bereits innerhalb der ersten Stunde nach der Infektion der Zelle mit HCMV (Kamata et al., 1978).

Bei der Expression der IE-Gene wird das IE1-Gen am aktivsten transkribiert. Es kodiert ein nukleäres Protein mit einer Größe von 72 kDa, das wahrscheinlich sowohl auf die virale als auch die zelluläre Transkription regulatorischen Einfluss hat (Stenberg et al., 1984). Dieser Bereich enthält das potentielle CMV-S/MAR-Element (Wirth, M, *unpublished*; vgl. Kriterien Abschnitt 3.1.1).

Der Aufbau der Region um das IE1-Gen wurde von Hennighausen und Fleckenstein (1986) beschrieben (Abb. 2-7). Stromaufwärts des Promotors des IE1-Gens (nt -780 bis -610) befinden sich vier hochaffine Bindestellen für den nukleären Faktor 1 (*nuclear factor 1*, NF1). Eine zusätzliche, stärkere NF1-Bindestelle ist im ersten Intron des IE1-Gens (nahe nt +350) vorhanden. NF1 ist ein Transkriptionsfaktor und kommt in einer großen Anzahl von Spezies vor (Nowock et al., 1985). Das Protein bindet als Homodimer eine Konsensussequenz doppelsträngiger DNA (de Vries et al., 1987) mit hoher Affinität, sofern diese nicht in einem Nukleosom verpackt ist (Pina et al., 1990; Blomquist et al., 1996). Die DNA-Bindedomäne ist hoch konserviert (Blomquist et al., 1999).

Die Affinitäten der NF1-Bindestellen in der Promotor-Region des IE1-Gens wurden relativ zueinander wie folgt bestimmt: V > I > II, III, IV (Hennighausen und Fleckenstein, 1986).

Das potentielle CMV-S/MAR-Element umfasst den Anfangsbereich der Promotor-Region des IE1-Gens und die NF1-Bindestellen I – IV und es endet stromaufwärts der potentiellen Enhancer-Region. Die Nähe zu einem Enhancer ist eine bei S/MAR-Elementen häufig auftretende Eigenschaft (Cockerill und Garrard, 1986a; Gasser und Laemmli, 1986; Cockerill et al., 1987). Darüber hinaus werden in einigen viralen Genomen Enhancer für die Replikation benötigt (deVilliers et al., 1984), was wiederum einen Zusammenhang zu S/MAR-Elementen herstellt.

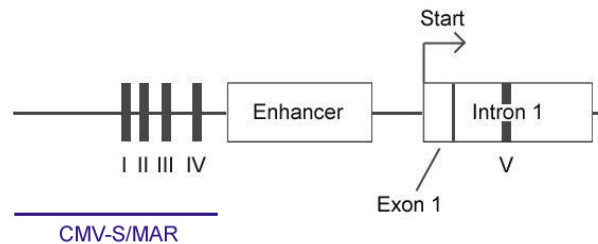


Abb. 2-7: Schematische, nicht proportionale Darstellung der HCMV-IE1-Gen Promotor-Region.

Beschriftungen: I – V NF1-Bindestellen, Enhancer potentielle Enhancer-Region, Start Transkriptionsstart des IE1-Gens, Exon 1 das erste Exon des IE1-Gens, Intron 1 das erste Intron des IE1-Gens. Darstellung basiert auf den Daten von Hennighausen und Fleckenstein (1986), GenBank X03922.1. Der Bereich, der das potentielle CMV-S/MAR-Element enthält, ist mit einer blauen Linie gekennzeichnet.

2.5.2 Minicircles

Mit der Entwicklung von pEpi-1 konnten Probleme, die vorher aufgrund der Verwendung viraler Proteine bei beispielsweise EBV-basierten Vektoren auftraten, überwunden werden (Piechaczek et al., 1999). Ein Nachteil dieser Art von Vektoren ist nach wie vor das Vorhandensein prokaryotischer Sequenzen, die für die Produktion der DNA in bakteriellen Systemen notwendig sind (Darquet et al., 1997). Diese können vermehrt methyliert werden (Garrick et al., 1998) und eine Heterochromatisierung im Bereich des Episoms hervorrufen (Nehlsen et al., 2006; Broll et al., 2010). Für die Anwendung in der Gentherapie muss darüber hinaus eine mögliche Immunantwort auf die prokaryotische DNA berücksichtigt werden, die i.d.R. einen vielfach erhöhten CpG-Anteil aufweist (Klinman et al., 1997; Hodges et al., 2004; Al-Dosari und Gao, 2009). Auch S/MAR-basierte Plasmide sind daher nicht vollständig zufriedenstellend. Ende der 1990er Jahre wurde deshalb das Konzept des ‚Minicircles‘ entwickelt (Darquet et al., 1997, 1999). Dieser entstand durch ortsspezifische Rekombination eines sog. Parentalplasmids und enthielt lediglich eine eukaryotische Expressionskassette (Darquet et al., 1997). Die bakteriellen Bestandteile wurden in Form des Miniplasmids entfernt.

Obwohl bereits diese Form des Minicircles zu einer im Vergleich mit dem unrekombinierten Plasmid erhöhten Transgenexpression führte (Darquet et al., 1999), wurde erst einige Jahre

später eine bedeutende Weiterentwicklung beschrieben. Nehlsen et al. (2006) hatten einen auf dem pEpi-Plasmid basierten Minicircle mittels Flp-Rekombination hergestellt, der in gängigen Säugerzelllinien ohne Selektionsdruck episomal etabliert werden konnte. Diese Minicircle-Generation vereint also die gute bakterielle Produzierbarkeit von gewöhnlichen Plasmiden mit der Möglichkeit der episomalen Etablierung von S/MAR-basierten Plasmiden, ohne prokaryotische Sequenzen zu enthalten. Die Rekombination kann dabei in Bakterien oder im eukaryotischen Expressionssystem selbst durchgeführt werden (Nehlsen et al., in Druck). In dieser Arbeit wurden Minicircles in Bakterien mithilfe des Flp/FRT Systems (Abschnitt 2.5.2.1) und eines Arabinose-induzierbaren Promotors (Abschnitt 2.5.2.2) hergestellt.

Den bakteriellen Minicircle-Herstellungsmöglichkeiten gemeinsam ist die Hürde, den Minicircle in reiner Form und in industriell ausreichenden Mengen zu erhalten. Nach der Präparation extrachromosomaler DNA aus Bakterien müssen die Minicircle-Moleküle vollständig von den Miniplasmid-Molekülen sowie restlichen Parentalplasmid-Molekülen abgetrennt werden. Dies erfordert mindestens einen weiteren Aufreinigungsschritt, der mit Verlusten der DNA einhergeht. Darüber hinaus ist die Rekombination oftmals nicht vollständig, wodurch die Minicircle-Ausbeute zusätzlich geschmälert wird.

In der Vergangenheit wurden für die Minicircle-Produktion bereits die Rekombinasen Cre (Bigger et al., 2001) und Flp (Nehlsen et al., 2006; Broll et al., 2010), die Phagen-Integrasen λ (Darquet et al., 1997; Kreiss et al., 1998) und Φ C31 (Chen et al., 2005; Yoon et al., 2009) sowie die ParA-Resolvase (Mayrhofer et al., 2008) eingesetzt. Erst Letztere genügt in Kombination mit einer Hochleistungsaffinitätschromatographie jedoch durch eine nahezu vollständige Rekombination (Effizienz > 99,5 %) und eine Minicircle-Reinheit von mehr als 98,5 % industriellen Ansprüchen und stellt damit einen Meilenstein der Minicircle-Produktion dar (RBPS-Technologie; Mayrhofer et al., 2008; Fa. *Plasmid Factory*). Für die chromatographische Aufreinigung sind im Minicircle sich wiederholende, modifizierte, sog. LacOs-Sequenzen des bakteriellen Laktose-Operators enthalten, die mit dem Repressor des Operons (LacI) mit hoher Affinität reversibel interagieren (Mayrhofer et al., 2008).

Weitere Ansätze für eine verbesserte Minicircle-Herstellung basieren auf dem Prinzip des ‚selbstzerstörenden Plasmids‘, indem Miniplasmid und Parentalplasmid nach der Rekombination mittels Restriktion *in situ* linearisiert und von bakteriellen DNasen abgebaut werden (Chen et al., 2005; Yoon et al., 2009). Dies könnte einen Aufreinigungsschritt sparen und dadurch die Minicircle-Ausbeute erhöhen. Zusammengefasst ist die Herstellung von Minicircles im großen Maßstab jedoch eine Herausforderung, die deren Einsatz in Industrie und Gentherapie bis heute einschränkt.

2.5.2.1 Das Flp/FRT-System

Für die Herstellung pEpi-basierter Minicircles wurde in der Vergangenheit sowie in der vorliegenden Arbeit auf das Flp/FRT-System zurückgegriffen (Nehlsen et al., 2006). Gegenüber der Cre-Rekombinase (Hoess und Abremski, 1985; Bigger et al., 2001) und ϕ C31-Integrase (Thorpe und Smith, 1998; Chen et al., 2003), die ebenfalls für die Minicircle-Herstellung verwendet werden können, bietet die Flp-Rekombinase Vorteile.

Die von der Cre-Rekombinase erkannte sog. loxP-Sequenz (34 bp) besteht aus zwei invertierten Sequenzwiederholungen von je 13 bp Länge und einem Spacer (8 bp) (Hoess und Abremski, 1985). Die Rekombinase ist in Säugerzellen aktiv, kann jedoch mit genomischen Pseudo-loxP-sites interagieren (Schmidt et al., 2000; Thyagarajan et al., 2000), wodurch die *in situ*-Herstellung des Minicircles erschwert wird.

Die Erkennungsstellen der Flp-Rekombinase (FRT-sites) bestehen ebenfalls aus zwei invertierten Sequenzwiederholungen (je 13 bp) und einem 8 bp langen Spacer. Zusätzlich besitzen sie eine dritte Sequenzwiederholung, die je nach Anwendung benötigt wird oder nicht (Andrews et al., 1985; Turan et al., 2011; Abb. 2-8).

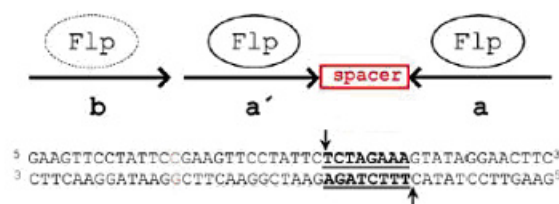


Abb. 2-8: Aufbau der FRT-site für die Rekombination mittels Flp-Rekombinase (modifiziert nach Turan et al., 2010).

Die Effizienz einer verbesserten, temperaturstabilen Flp-Variante (Flpe; Buchholz et al., 1998) ist noch immer geringer als die der Cre-Rekombinase (Andreas et al., 2002). Erst durch die Herstellung der in Säugerzellen aktiven, sog. Flpo-Variante konnte eine mit Cre vergleichbare Rekombinationseffizienz erreicht werden (Raymond und Soriano, 2007). Die Vorteile, die Flp gegenüber Cre auszeichnen, betreffen daher weniger deren Effizienz, sondern vielmehr erweiterte Anwendungsmöglichkeiten von Minicircles. Durch Mutation der Spacer-Sequenz lassen sich heterospezifische FRT-sites herstellen (Turan et al., 2010), die wegen ihrer Länge ein Leseraster nicht verändern (48 bp). Aufgrund des eukaryotischen Ursprungs der Flp sollte sie zudem im Chromatinkontext optimal funktionieren (Schübeler et al., 1998; Turan et al., 2010). Die hohe Spezifität, die auch mit heterospezifischen FRT-sites erreicht werden kann, eröffnet Möglichkeiten der Verknüpfung von episomalen Systemen wie pEpi-1 und Minicircles mit den Prinzipien des RMCE. So könnte ein etabliertes Episom durch Verabreichung der Flp-Rekombinase eine Expressionskassette zu einem spezifisch

ausgewählten Zeitpunkt in das Säugergenom integrieren oder sie entfernen (Nehlsen et al., in Druck). An diesem Punkt wird ein Nachteil der ϕ C31-Integrase deutlich, da sie die Erkennungsstellen nach der Rekombination verändert, so dass diese nicht mehr verwendet werden können (Groth et al., 2000). Die Verwendung des Flp/FRT-Systems hat demnach insbesondere zukunftsorientierte Gründe.

2.5.2.2 Arabinose-Induktion – das pBAD-System

Der Arabinose-induzierbare Promotor pBAD (bzw. araBAD) des L-Arabinose-Operons von *E. coli* wird sowohl positiv als auch negativ durch das Protein AraC reguliert (Ogden et al., 1980; Abb. 2-9).

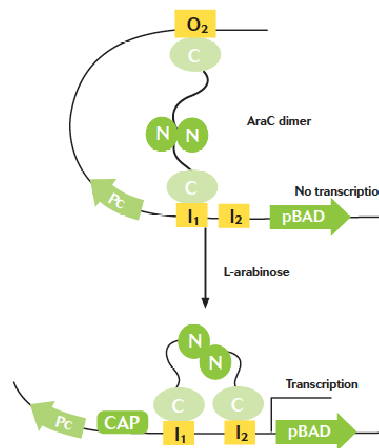


Abb. 2-9: Positive und negative Regulation des pBAD-Promotors durch AraC (modifiziert nach Invitrogen, pBAD expression system).

In Abwesenheit von L-Arabinose bindet das AraC-Dimer die regulatorischen Sequenzen O_2 und I_1 und der pBAD-Promotor ist reprimiert. Bei Zugabe von L-Arabinose bindet AraC an beide I -Sequenzen. Dies führt zu der Aktivierung des pBAD-Promotors.

In Abwesenheit von L-Arabinose bindet AraC die regulatorischen Sequenzen O_2 und I_1 , was zu einer Schleifenbildung der DNA und der Repression des pBAD-Promotors führt (Lobell und Schleif, 1990). Wenn AraC mit L-Arabinose interagiert, wird diese Schleife aufgelöst und der pBAD-Promotor aktiviert (Lobell und Schleif, 1990; Soisson et al., 1997). Für eine maximale Induktion sollte darüber hinaus ein Komplex aus cAMP activator protein (CAP) und cAMP mit der DNA interagieren, da dies die Bindung von AraC an die I -Stellen verstärkt (Invitrogen, pBAD expression systems).

Basale Expressionslevel des pBAD-Promotors können durch die Zugabe von Glukose zu dem Kulturmedium verringert werden, da diese den cAMP-Spiegel senkt (Miyada et al., 1984; Guzman et al., 1995). Insbesondere für die Produktion toxischer Proteine ist diese Maßnahme sinnvoll und notwendig (Guzman et al., 1995).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses pEpi-basierter Minicircles und eines neuartigen, potentialen S/MAR-Elements auf die transiente Genexpression in adhärenenten HEK293-Zellen.

Die Identität des potentialen CMV-S/MAR-Elements sollte zunächst mittels bioinformatischer Analyse (SIDD und MAR-Wiz) bestätigt werden. PEpi-basierte Minicircles sollten im Vergleich zu den entsprechenden Parentalplasmiden hinsichtlich der Expressionshöhe zweier unterschiedlicher Reporter (Gaussia Luciferase und d2EGFP) in der transienten Phase untersucht werden. Damit sollte gezeigt werden, ob Minicircles bei der transienten Genexpression gegenüber vollständigen Plasmiden Vorteile bieten. Die Wirkung der potentiellen CMV-S/MAR sollte in diesem Zusammenhang mit dem bekannten M18-S/MAR-Element (Broll et al., 2010) sowie S/MAR-freien Kontrollen verglichen werden. Der Einfluss der CMV-S/MAR auf die Expression in zwei kommerziell erhältlichen Plasmiden (pCMV-GLuc der Fa. *New England Biolabs*; Abwandlung des Plasmids pd2EGFP-Basic der Fa. Clontech) sollte sowohl stromaufwärts des Reportergens (analog zu pEpi) als auch stromabwärts des verwendeten CMV-Promotors untersucht werden.

Für die Produktion ausreichender Minicircle-Mengen für den Labormaßstab sollte ein reproduzierbares Herstellungssystem entwickelt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich des CMV- und des M18-S/MARs mit bioinformatischen Methoden

3.1.1 Identität des CMV-S/MAR-Elements

Das M18-S/MAR-Element wurde in der Vergangenheit hinsichtlich seiner Eigenschaften untersucht und ließ sich eindeutig als S/MAR identifizieren (Broll et al., 2010). Dieser Beweis wurde für das potentielle CMV-S/MAR-Element bisher nicht erbracht, jedoch gab es Hinweise auf eine S/MAR-Identität (Wirth, M., *unpublished*).

Im Allgemeinen erweist sich die Vorhersage einer S/MAR als schwierig, da keine Konsensussequenzen oder gemeinsamen Motive existieren (Ludérus et al., 1994). Neben der experimentellen Analyse gibt es bioinformatische Ansätze, die die Identität eines S/MAR-Elements voraussagen sollen bzw. Hinweise auf das Vorliegen eines S/MAR-Elements geben können.

Für die bioinformatische Analyse der CMV-S/MAR wurden in dieser Arbeit zwei Methoden angewandt, mit deren Hilfe die S/MAR-Identität belegt werden sollte: ein Struktur-Vorhersageprogramm (*stress-induced duplex destabilization*; SIDD) und ein Sequenz-Motiv-orientiertes Programm (MAR-Wiz).

Anhand eines SIDD-Profiles lässt sich die Destabilisierung einer Region in einem zirkulären DNA-Molekül unter Stress voraussagen ($\sigma = -0,05$). Sowohl die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit $p(x)$ für eine Duplexöffnung als auch die inkrementelle freie Energie $G(x)$, die für die Trennung eines Basenpaares an der Position x benötigt wird, werden berechnet (Benham, 1993). Charakteristisch für S/MARs ist eine deutliche Destabilisierung, die sich im SIDD-Profil durch negative Peaks zeigt (Kohwi-Shigematsu und Kohwi, 1990; Benham et al., 1997; s. Abschnitt 2.2.3.2).

Ergänzend zur SIDD-Analyse durchsucht das Programm MAR-Wiz DNA-Sequenzen auf der Basis mehrerer Kriterien, die auf die Identität einer S/MAR hinweisen können. Werden die Ergebnisse beider Analysemethoden ergänzend betrachtet, so führt dies zu einer bioinformatisch gesicherten Aussage, ob ein S/MAR-Element vorliegt oder nicht (vgl. dazu Goetze, 2003).

Die vollständigen SIDD-Profile der beiden Minicircles MC_d-CMV (mit CMV-S/MAR) und MC_d-M18 (mit M18-S/MAR) sind in Abb. 3-1 (b und e) dargestellt. Zusätzlich wurde der Ausschnitt, der nur das jeweilige S/MAR-Element enthält, für einen genaueren Vergleich vergrößert (Abb. 3-1 a und d). Das MAR-Potential beider Minicircles ist unter den SIDD-Profilen gezeigt (Abb. 3-1 c und f).

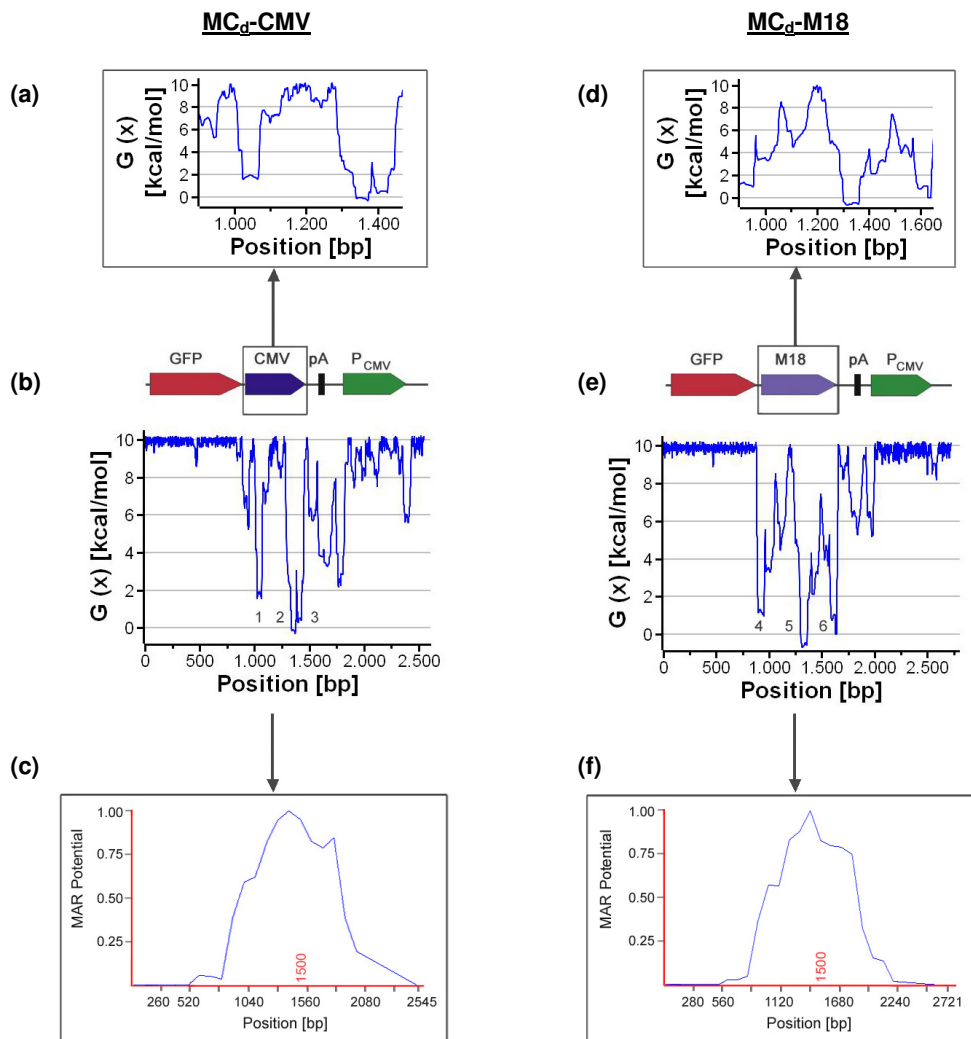


Abb. 3-1: Vergleich des CMV- und des M18-S/MAR-Elements im SIDD- und im MAR-Profil.

Die Sequenzen der Minicircles MC_d -CMV und MC_d -M18 (Bezeichnung entsprechend Abb. 3-8, S. 65) wurden mittels SIDD (<http://orange.genomecenter.ucdavis.edu/benham/sidd/>) und MAR-Wiz (<http://genomecluster.secs.oakland.edu/marwiz/>) analysiert. Dargestellt sind die SIDD-Profile beider Minicircles ($G(x)$ in Abhängigkeit von der Position im MC) für die vollständige Sequenz bzw. das jeweilige S/MAR-Element und die MAR-Wahrscheinlichkeit (MAR-Potential in Abhängigkeit von der Position im MC). Schematisch sind über den beiden vollständigen Profilen die dazugehörigen funktionellen Elemente des MCs angegeben: GFP d2EGFP-Gen, pA SV40 PolyA-site, P_{CMV} CMV-Promotor, CMV CMV-S/MAR, M18 M18-S/MAR. Auf die Darstellung der FRT-sites wurde für eine bessere Übersicht verzichtet. (a) S/MAR-Ausschnitt des SIDD-Profils von MC_d -CMV, (b) SIDD-Profil des Minicircles MC_d -CMV, (c) MAR-Potential des Minicircles MC_d -CMV; (d) S/MAR-Ausschnitt des SIDD-Profils von MC_d -M18, (e) SIDD-Profil des Minicircles MC_d -M18, (f) MAR-Potential des Minicircles MC_d -M18. In den Abbildungen (b) und (e) wurden die Peaks von unpairing elements (UEs) nummeriert.

Die SIDD-Profile (Abb. 3-1 b und e) zeigen für den Bereich des CMV- bzw. des M18-S/MAR-Elements eine deutliche Destabilisierung (Peaks mit $G(x) < 2$). Bei beiden S/MARs gibt es drei starke Minima (Abb. 3-1 b und e, Peaks 1 – 6). Je nach Interpretation könnten die Minima 2 und 3 allerdings zu einem Peak zusammengefasst werden, wohingegen das

Minimum 6 auch zwei Peaks darstellen könnte. In der Gesamtheit betrachtet ist das M18-S/MAR-Element über die gesamte Länge stärker destabilisiert als das CMV-S/MAR-Element (Abb. 3-1 a und d). Eine gewisse Periodizität der *unpairing elements* (UEs; Minima 1 – 6) ist bei beiden S/MAR-Elementen zu erkennen (vgl. Bode et al., 2003, 2006).

Der Einfluss der jeweiligen S/MAR auf die restliche Sequenz der beiden Minicircles ist ebenfalls sichtbar (Abb. 3-1 b und e). Die Polyadenylierungsstelle und der CMV-Promotor sind im Minicircle mit CMV-S/MAR stärker destabilisiert als im Minicircle mit M18-S/MAR.

Die Analyse der Minicircle-Sequenzen mit MAR-Wiz (Abb. 3-1 c und f) ergibt sowohl für das CMV-S/MAR- als auch das M18-S/MAR-Element ein Maximum des MAR-Potentials.

Zusammen mit dem Ergebnis der SIDD-Analyse konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei der als ‚CMV-S/MAR‘ bezeichneten Sequenz tatsächlich um ein S/MAR-Element handelt.

Das SIDD-Profil der gesamten Promotor-Region des IE1-Gens des humanen Zytomegalievirus ist in Abb. 3-2 dargestellt. Im ursprünglichen Kontext des Virusgenoms sowie im Minicircle (Abb. 3-1 a) ist das Destabilisierungsverhalten des CMV-S/MAR-Elements nahezu identisch. Das Wahrscheinlichkeitsprofil $p(x)$ verdeutlicht darüber hinaus, dass die Bindestellen II bis IV des nukleären Faktors 1 (NF1) mit den Sequenzen kolokalisieren, bei denen die S/MAR die wahrscheinlichste Strangöffnung erfahren wird.

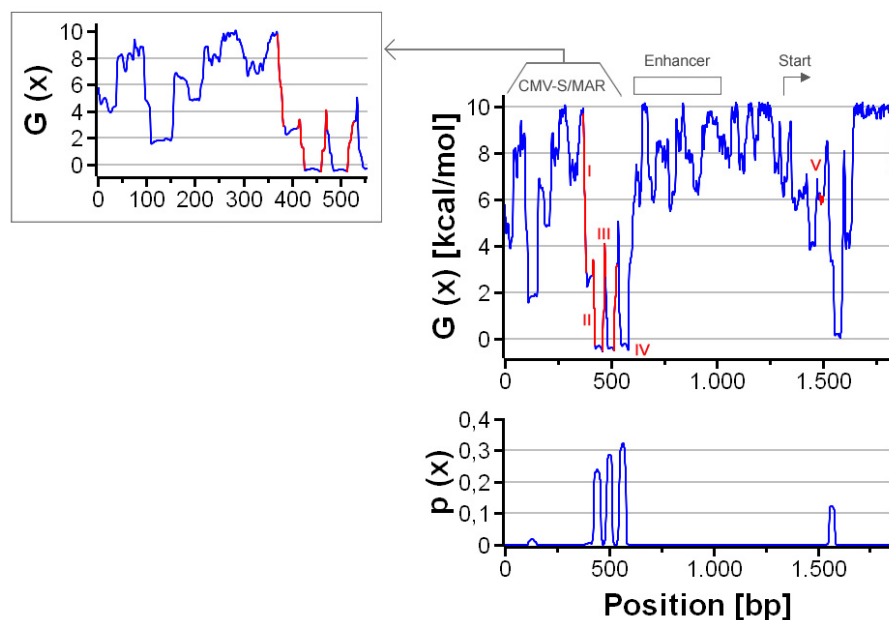


Abb. 3-2: Destabilisierung der HCMV-IE1-Gen Promotor-Region.

Dargestellt sind das SIDD-Profil $G(x)$ der IE1 Promotor-Region des humanen Zytomegalievirus sowie die Wahrscheinlichkeit einer Strangtrennung $p(x)$. Das SIDD-Profil des CMV-S/MAR-Elements ist zusätzlich vergrößert angegeben (s. grauen Kasten). Die NF1-Bindestellen sind in rot eingezeichnet und mit I – V markiert. Weitere Beschriftungen: Enhancer potentielle Enhancer-Region, Start Beginn des ersten Exons des IE1-Gens.

3.1.2 Vergleich des S/MAR-Einflusses auf die verwendeten d2EGFP-Vektoren

Um den Einfluss beider S/MARs auf die Destabilisierung in den verwendeten Minicircles und Parentalplasmiden näher zu untersuchen, wurden für die sechs Minicircles und Parentalplasmide mit dem Reporter d2EGFP jeweils SIDD-Profile erstellt (Abb. 3-3).

Vergleich MC / PP (Abb. 3-3 a – c):

Die SIDD-Profile jedes Minicircles wurden mit dem Profil des korrespondierenden Parentalplasmids in einer Grafik zusammengefasst, um Unterschiede zu verdeutlichen (Abb. 3-3 a – c). Insbesondere die Polyadenylierungsstelle kann hier als interner Standard herangezogen werden.

Im Minicircle ohne S/MAR (Abb. 3-3 a) ist der Bereich der PolyA-Stelle und des CMV-Promotors destabilisiert, im entsprechenden Parentalplasmid hingegen kaum bzw. gar nicht. Ein starker negativer Peak ist beim Parentalplasmid im Anfangsbereich des Replikationsursprungs sichtbar.

Die Unterschiede zwischen Minicircle und Parentalplasmid mit CMV-S/MAR sind vor allem in der S/MAR-Region ausgeprägt (Abb. 3-3 b). Im Parentalplasmid ist im Bereich der CMV-S/MAR nur ein deutlicher, negativer Peak vorhanden ($G(x) < 4$). Der Minicircle enthält in dieser Region zwei bis drei Peaks, die darüber hinaus teilweise stärker destabilisiert sind ($G(x) < 2$). Die Polyadenylierungsstelle ist im Minicircle ebenfalls deutlicher destabilisiert als im Parentalplasmid ($G(x) \sim 4$ (MC), ~ 8 (PP)).

Im Minicircle mit M18-S/MAR ist sowohl die Destabilisierung der PolyA-Stelle als auch der S/MAR stärker als im entsprechenden Parentalplasmid (Abb. 3-3 c). Die Unterschiede zwischen Minicircle und Parentalplasmid sind in dieser Konstellation allerdings geringer ausgeprägt als bei den beiden CMV-S/MAR-Vektoren.

Vergleich der Minicircles untereinander (Abb. 3-3 d, f, h):

Sowohl die Polyadenylierungsstelle als auch der CMV-Promotor sind im Minicircle ohne S/MAR deutlicher destabilisiert als im Minicircle mit CMV-S/MAR und im Minicircle mit M18-S/MAR (Abb. 3-3 d, f, h). Letzterer zeigt in beiden genannten Regionen die geringste (PolyA) bis gar keine (P_{CMV}) Destabilisierung.

Wie bereits erwähnt ist die S/MAR-Region beim M18-S/MAR-Element stärker destabilisiert als jene beim CMV-S/MAR-Element. Beide bilden im jeweiligen Minicircle jedoch den Ort der wahrscheinlichsten Strangöffnung (Wahrscheinlichkeitsprofile nicht gezeigt).

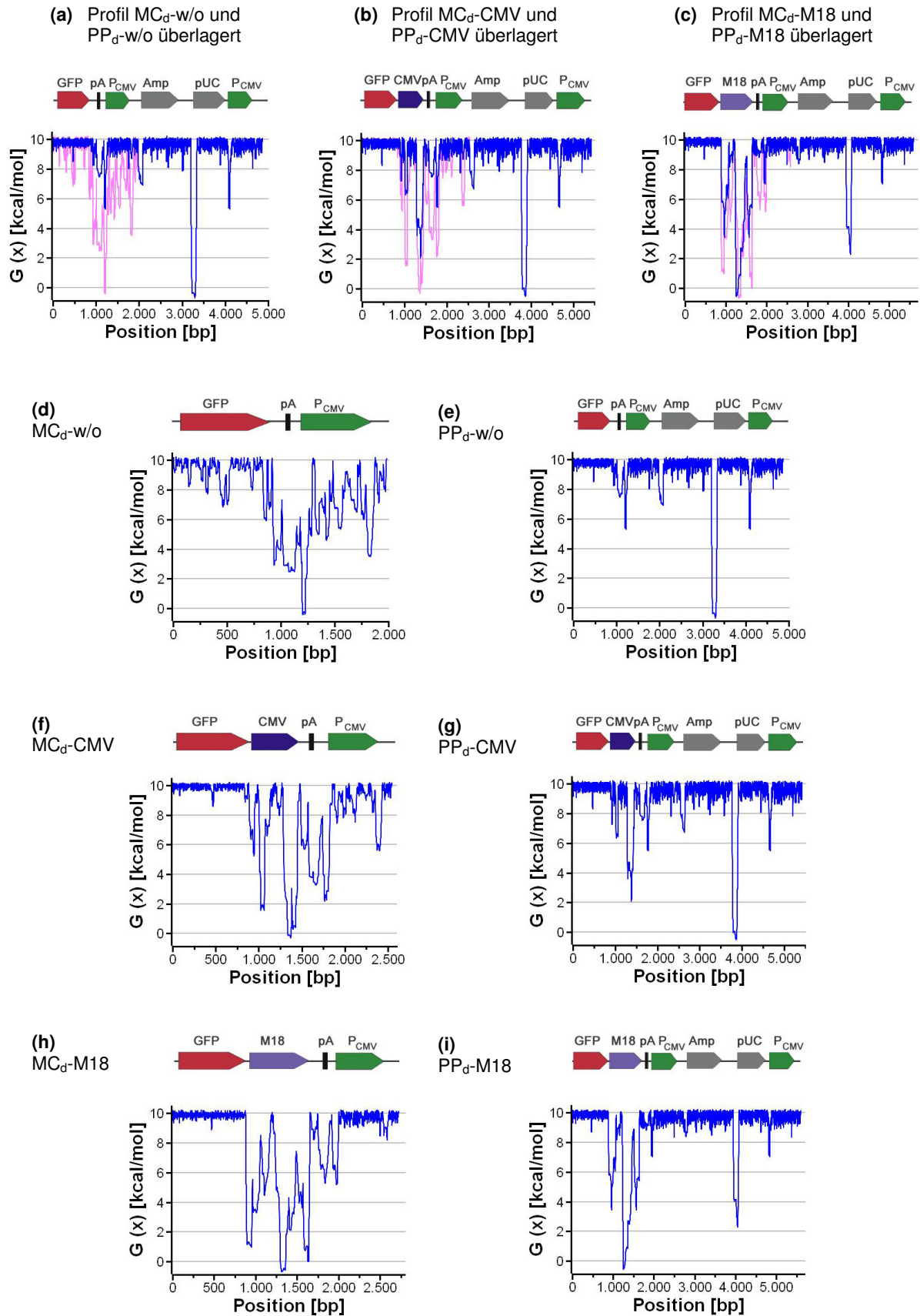


Abb. 3-3: SIDD-Profil der verwendeten Minicircles und Parentalplasmide mit dem Reporter d2EGFP.
(Bildunterschrift auf der folgenden Seite)

Abb. 3-3: SIDD-Profile der verwendeten Minicircles und Parentalplasmide mit dem Reporter d2EGFP.

Dargestellt sind die SIDD-Profile ($G(x)$) in Abhängigkeit von der Position im MC bzw. PP der drei Minicircles MC_d-w/o, MC_d-CMV und MC_d-M18 sowie der drei Parentalplasmide PP_d-w/o, PP_d-CMV und PP_d-M18 (Bezeichnung entsprechend Abb. 3-8, S. 65). Schematisch sind über jedem Profil die dazugehörigen funktionellen Elemente des MCs bzw. des PPs angegeben: GFP d2EGFP-Gen, pA SV40 PolyA-site, P_{CMV} CMV-Promotor, CMV CMV-S/MAR, M18 M18-S/MAR, Amp Ampicillinresistenz, pUC Replikationsursprung (pUC). Auf die Darstellung der FRT-sites wurde für eine bessere Übersicht verzichtet. **(a)** SIDD-Profile des MCs und des PPs ohne S/MAR überlagert (MC in rosa, PP in blau); **(b)** SIDD-Profile des MCs und des PPs mit CMV-S/MAR überlagert (MC in rosa, PP in blau); **(c)** SIDD-Profile des MCs und des PPs mit M18-S/MAR überlagert (MC in rosa, PP in blau); **(d)** SIDD-Profil des MCs ohne S/MAR; **(e)** SIDD-Profil des PPs ohne S/MAR; **(f)** SIDD-Profil des MCs mit CMV-S/MAR; **(g)** SIDD-Profil des PPs mit CMV-S/MAR; **(h)** SIDD-Profil des MCs mit M18-S/MAR; **(i)** SIDD-Profil des PPs mit M18-S/MAR.

Vergleich der Parentalplasmide untereinander (Abb. 3-3 e, g, i):

In Bezug auf die Polyadenylierungsstelle ähneln sich die Profile des Parentalplasmids ohne S/MAR und mit CMV-S/MAR ($G(x) \sim 8$). Im Parentalplasmid mit M18-S/MAR ist diese Region hingegen kaum destabilisiert.

Das CMV-S/MAR-Element weist im Parentalplasmid (tiefstes UE: $G(x) = 2 - 4$) eine deutlich geringere Destabilisierung auf als das M18-S/MAR-Element (tiefstes UE: $G(x) < 0$) (Abb. 3-3 g und i). Dies hat auch Auswirkungen auf die Wahrscheinlichkeitsprofile $p(x)$ (Daten nicht gezeigt). Die wahrscheinlichste Strangöffnung passiert im PP_d-CMV am pUC-Replikationsursprung, im PP_d-M18 hingegen am S/MAR-Element selbst.

Anhand der bioinformatischen Analyse des CMV-S/MAR-Elements konnte die S/MAR-Identität nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Destabilisierung zeigen die CMV- und die M18-S/MAR Unterschiede, die nicht nur die S/MAR-Region selbst betreffen, sondern sich auch auf andere Bereiche der zirkulären DNA auswirken. Darüber hinaus weichen die SIDD-Profile der Minicircles partiell von denen der Parentalplasmide ab. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich bei den CMV-S/MAR-Vektoren: im Minicircle ist die wahrscheinlichste Strangöffnung in der S/MAR zu erwarten, im Parentalplasmid hingegen im pUC-Replikationsursprung. Im Allgemeinen sind die für eine Strangtrennung anfälligen Bereiche im Minicircle stärker destabilisiert als im korrespondierenden Parentalplasmid.

3.2 Bestimmung der Halbwertszeit von Gaussia Luciferase

Gaussia Luciferase (GLuc) ist ein in den Zellüberstand sekretiertes Protein, das in dieser Arbeit für die Transfektionsexperimente zum Vergleich von Minicircles und Parentalplasmiden und S/MAR-haltigen mit S/MAR-losten Vektoren verwendet wurde und als äußerst stabil gilt.

Während des Zeitraums der Probenahme sollten möglichst geringe GLuc-Aktivitätsverluste auftreten, um die Messungen nicht negativ zu beeinflussen. Die Quantifizierung dieses Parameters erfolgte durch Bestimmung der Halbwertszeit der Gaussia Luciferase.

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Gaussia Luciferase wurden GLuc-haltige Überstände aus einem vorangegangenen Transfektionsexperiment verwendet. Diese wurden dem Überstand von nicht-transfizierten HEK293-Zellen extern zugeführt. Darüber hinaus wurde ein GLuc-haltiger Überstand ohne Zellen in einer 24-Loch-Platte über einen Zeitraum von sieben Tagen inkubiert (Abb. 3-4). Jeden Tag wurden Proben des Überstands entnommen und luminometrisch vermessen.

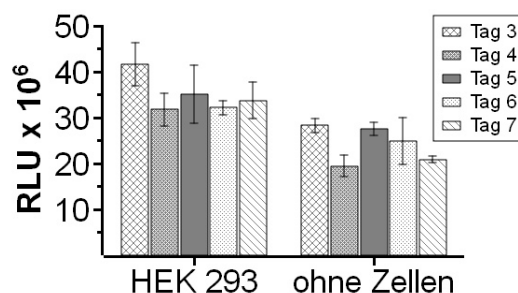


Abb. 3-4: Halbwertszeit der Gaussia Luciferase.

Bestimmung der Halbwertszeit der Gaussia Luciferase im zentrifugierten Überstand von nicht-transfizierten HEK293-Zellen sowie ohne Vorhandensein von Zellen in einer 24-Loch-Platte über einen Zeitraum von einer Woche. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Messungen der GLuc-Expression ($RLU \cdot 10^6$) mit Fehlerindikatoren.

Durch lineare Regression wurden die folgenden Halbwertszeiten bestimmt: HEK293-Ansatz → HWZ 12 bis 16 Tage; Ansatz ohne Zellen → HWZ ≥ 3 Wochen.

Die Halbwertszeit wurde durch lineare Regression der Messwerte bestimmt. Sie betrug im Überstand nicht-transfizierter HEK293-Zellen 12 bis 16 Tage. Die Auswertung der Inkubation des GLuc-haltigen Überstandes ohne Zellen ergab eine Halbwertszeit von mindestens drei Wochen. Folglich mussten für die angewendeten Messzeiträume, die zwischen ein und drei Tagen betrugen, keine Aktivitätseinbußen der Gaussia Luciferase berücksichtigt werden.

3.3 Optimierung des Transfektionsprotokolls von HEK293-Zellen mit Lipofectamine-2000

Für die Transfektion von Minicircles ist insbesondere die Lipofektion geeignet, da sie nicht mit dem superhelikalen Status der DNA interferiert (Broll et al., 2010; vgl. Abschnitt 2.3.2). Darüber hinaus konnte Hansen (2001) zeigen, dass sich bei Transfektion adhärenter HEK293-Zellen Lipofectamine-2000 eignet, um hohe Transfektionseffizienzen zu erzielen. Dies war daher in der vorliegenden Arbeit die Methode der Wahl.

Eine Optimierung des Protokolls für die Transfektion von HEK293-Zellen war notwendig. Die Herstellerfirma Invitrogen schlägt für eine 24-Loch-Platte eine zu transfizierende Menge von 800 ng DNA und 2 µg Lipofectamine-2000 je Loch vor. Die in dieser Arbeit erhaltenen Minicircle-Ausbeuten waren allerdings weitaus geringer. Daher musste das Protokoll für geringe Mengen transfizierter DNA optimiert werden. Dies erfolgte in mehreren Schritten und aufgrund von Minicircle-Limitierungen unter Verwendung eines Parentalplasmids.

3.3.1 Erster Optimierungsschritt: DNA-Konzentrationsreihe

Zuerst einmal wurden unterschiedliche Mengen (20 ng bis 800 ng) des Parentalplasmids pEpi-CMV_ΔMAR_d2EGFP (PP_Δ-CMV gemäß Abb. 3-8, S. 65) mit 2 µg LF-2000 je Ansatz transfiziert. Eine Übersicht der Transfektionsansätze ist in Tab. 3-1 aufgeführt.

Tab. 3-1: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit variablem DNA:LF-2000-Verhältnis.

Eine Übersicht der Ansätze für den ersten Schritt der Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen ist dargestellt. Das Parentalplasmid pEpi-CMV_ΔMAR_d2EGFP (PP_Δ-CMV gemäß Abb. 3-8, S. 65) wurde in unterschiedlichen Mengen transfiziert. Angegeben ist zum besseren Verständnis auch die entsprechende molare Menge des Plasmids. Die eingesetzte LF-2000-Menge je Transfektionsansatz war konstant (2 µg gemäß Protokoll Fa. Invitrogen).

Ansatz Nr.	DNA-Menge [ng]	DNA-Menge [fmol]
A	800	223
B	600	168
C	400	112
D	200	56
E	100	28
F	50	14
G	20	6

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte drei Tage nach der Transfektion (Abb. 3-5).

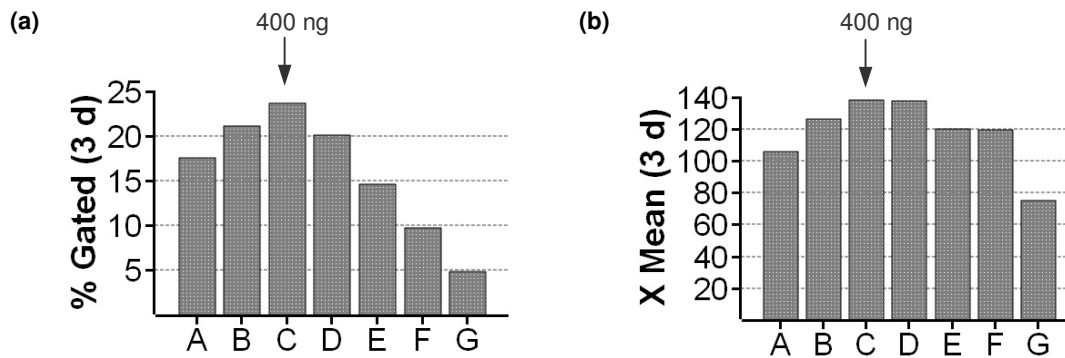


Abb. 3-5: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit variablem DNA:LF-2000-Verhältnis.

Das Parentalplasmid pEpi-CMV_α d2EGFP (PP_α-CMV) wurde in unterschiedlichen Mengen transfiziert (800 ng bis 20 ng, Ansätze A bis G entsprechend Tab. 3-1, S. 60). Dargestellt sind der Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen (% Gated, a) sowie die mittlere Expression (X Mean, b) aller exprimierenden Zellen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte drei Tage nach der Transfektion (3 d).

Gemäß Abb. 3-5 lag das Optimum der transfizierten Menge des Parentalplasids PP_α-CMV bezüglich des Anteils d2EGFP-exprimierender Zellen bei 400 ng DNA, bezüglich der mittleren Expression bei 200 ng bis 400 ng DNA. Eine Verringerung der transfizierten DNA-Menge auf 20 ng (entsprechend 6 fmol) führte zu großen Verlusten beim Anteil exprimierender Zellen (25 % → 5 %). Die Auswirkungen auf die mittlere Expression waren geringer (etwa Halbierung des X Mean-Wertes).

Insgesamt stellte sich heraus, dass die für die Expressionsanalysen angestrebte Menge von etwa 28 fmol bis 56 fmol transfizierter Plasmid-DNA (Abb. 3-5, Ansätze E und D entsprechend) im Hinblick auf beide Messparameter (% Gated und X Mean) verglichen mit den optimalen Bedingungen vertretbar war.

3.3.2 Zweiter Optimierungsschritt: Konstantes DNA:LF-2000-Verhältnis

Das Verhältnis aus transfizierter DNA und Lipofectamine-2000 war im vorherigen Schritt bei jedem Ansatz unterschiedlich. Daher sollte nun der Einfluss einer Anpassung der LF-2000-Menge an die transfizierte DNA-Menge getestet werden (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit konstantem DNA:LF-2000-Verhältnis.

Eine Übersicht der Ansätze für den zweiten Schritt der Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen ist dargestellt. Das Parentalplasmid PP_d-CMV wurde in unterschiedlichen Mengen transfiziert. Angegeben ist zum besseren Verständnis auch die entsprechende molare Menge des Plasmids. Die eingesetzte LF-2000-Menge je Transfektionsansatz wurde angepasst, so dass ein konstantes DNA:LF-2000-Verhältnis von 0,4 ng/ng beibehalten wurde.

Ansatz Nr.	DNA-Menge [ng]	DNA-Menge [fmol]	LF-2000-Menge [µg]
H	600	168	1,5
I	400	112	1
J	200	56	0,5
K	100	28	0,25
L	50	14	0,125
M	20	6	0,05

Eine Anpassung des DNA:LF-2000-Verhältnisses mit einhergehender Verringerung der Lipofectamine-2000-Menge erwies sich nicht als sinnvoll (Abb. 3-6). Der Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen sowie die mittlere Expression zeigten eine starke Abhängigkeit von der für die Transfektion eingesetzten LF-2000-Menge (bis zu 98 % Abnahme).

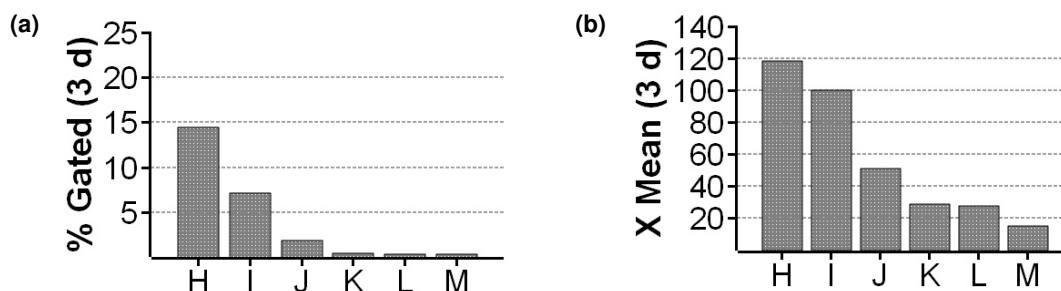


Abb. 3-6: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit konstantem DNA:LF-2000-Verhältnis.

Das Parentalplasmid PP_d-CMV wurde in unterschiedlichen Mengen transfiziert (600 ng bis 20 ng, Ansätze H bis G entsprechend Tab. 3-2, S.62). Dargestellt sind der Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen (% Gated, a) sowie die mittlere Expression (X Mean, b) aller exprimierenden Zellen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte drei Tage nach der Transfektion (3 d).

3.3.3 Dritter Optimierungsschritt: Erhöhung der eingesetzten LF-2000-Menge

Da geringere LF-2000-Konzentrationen zu Expressionsverlusten führten, sollte der Einfluss einer erhöhten LF-2000-Menge auf die d2EGFP-Expression getestet werden. Dazu wurden je vier verschiedene Mengen des Parentalplasmids PP_d-CMV mit jeweils vier unterschiedlichen Mengen LF-2000 transfiziert (Tab. 3-3). Zusätzlich erfolgte eine Transfektion mit dem Minicircle MCpEpi-CMV_{MAR}_d2EGFP (MC_d-CMV, Abb. 3-8, S. 65) analog zu dem Parentalplasmid-Ansatz D (Minicircle-Ansatz Q, 50 ng bzw. 30 fmol DNA).

Tab. 3-3: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit erhöhter LF-2000-Menge.

Eine Übersicht der Ansätze für den dritten Schritt der Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen ist dargestellt. Das Parentalplasmid PP_d-CMV wurde in unterschiedlichen Mengen transfiziert. Angegeben ist zum besseren Verständnis auch die entsprechende molare Menge des Plasmids. Es wurden zusätzlich jeweils vier verschiedene Mengen LF-2000 je Transfektionsansatz eingesetzt. Ansatz Q beinhaltet die Transfektion des Minicircles MC_d-CMV (50 ng).

Ansatz-Nr.	DNA-Menge [ng]	DNA-Menge [fmol]	LF-2000-Menge [µg]
A	400	112	2,0
B	200	56	2,0
C	100	28	2,0
D	50	14	2,0
E	400	112	2,5
F	200	56	2,5
G	100	28	2,5
H	50	14	2,5
I	400	112	3,0
J	200	56	3,0
K	100	28	3,0
L	50	14	3,0
M	400	112	3,5
N	200	56	3,5
O	100	28	3,5
P	50	14	3,5
Q (MC)	50	30	2,0

Für transfizierte DNA-Mengen von 50 ng bis 100 ng hatte eine Erhöhung der LF-2000-Menge auf mehr als 2 µg gemäß Abb. 3-7 kaum einen Einfluss auf den Anteil exprimierender Zellen und die mittlere Expression.

Erst bei einer Transfektion von 200 ng bzw. 400 ng konnte mit einer Erhöhung der LF-2000-Menge auf 2,5 µg oder 3 µg ein höherer Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen erreicht werden (Abb. 3-7 a). Auch die mittlere Expression konnte leicht gesteigert werden (Abb. 3-7 b).

Für die in dieser Arbeit einzusetzenden, geringen DNA-Mengen war der positive Einfluss einer höheren LF-2000-Menge auf die Expression zu gering, als dass sie den höheren Kostenfaktor des Transfektionsreagenzes rechtfertigen konnten.

Der Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen sowie die mittlere Expression waren drei Tage nach der Transfektion beim Minicircle MC_d-CMV (Ansatz Q) höher als beim Parentalplasmid-Ansatz mit gleicher Massenmenge (50 ng, 14 fmol) und gleicher molarer Menge (100 ng, 28 fmol) (Abb. 3-7). Zudem war die mittlere Expression von 30 fmol transfiziertem Minicircle fast 40 % höher als jene von 112 fmol transfiziertem Parentalplasmid (Abb. 3-7, d; 400 ng Parentalplasmid).

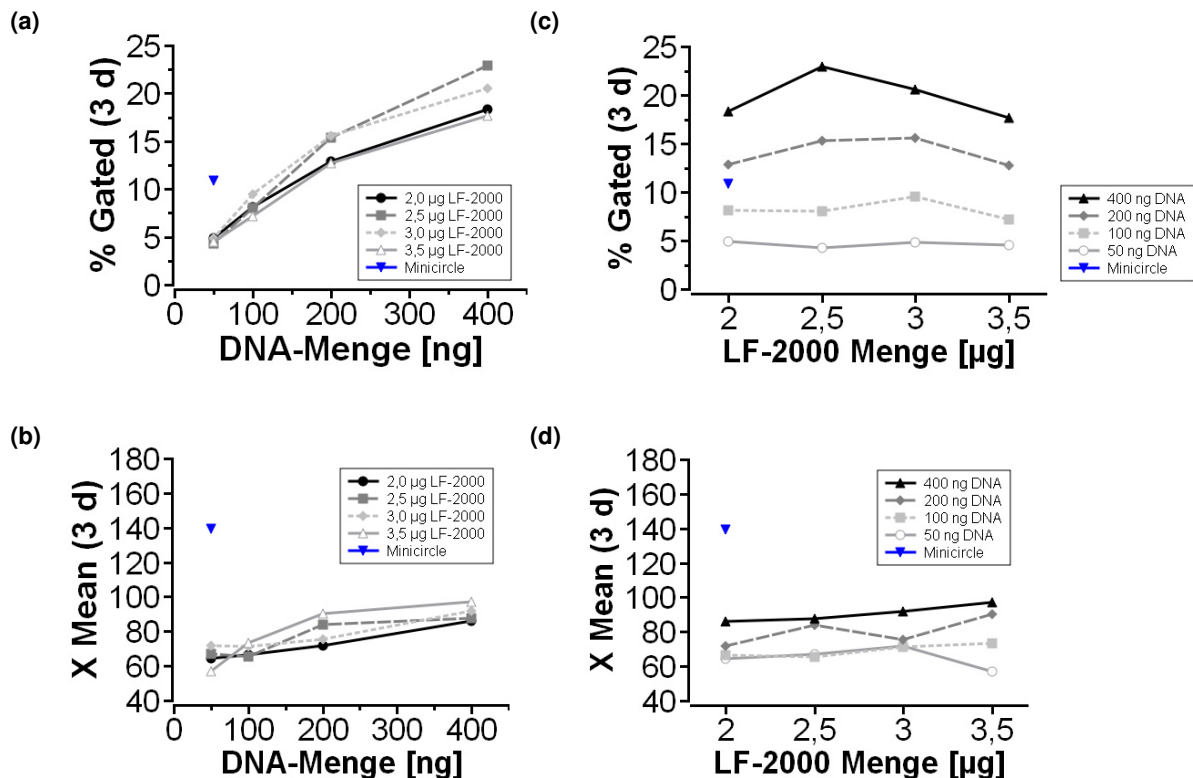


Abb. 3-7: DNA-Konzentrationsreihe zur Optimierung des LF-2000-Transfektionsprotokolls für HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten mit erhöhter LF-2000-Menge.

Das Parentalplasmid PP α -CMV wurde in unterschiedlichen Mengen transfiziert (50 ng bis 400 ng, Ansätze entsprechend Tab. 3-3, S.63). Dargestellt sind der Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen (% Gated, a und c) sowie die mittlere Expression (X Mean, b und d) aller exprimierenden Zellen. Die Messung erfolgte drei Tage nach der Transfektion (3 d). **(a) und (b):** Zusammenfassung gleicher LF-2000-Mengen, Darstellung in Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge; **(c) und (d):** Zusammenfassung gleicher DNA-Mengen, Darstellung in Abhängigkeit von der für die Transfektion eingesetzten LF-2000-Menge. Die Transfektion des Minicircles MC α -CMV (50 ng DNA, 2 µg LF-2000) ist jeweils gesondert angegeben (blaues Dreieck).

Die Ergebnisse der drei Optimierungsschritte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Die Transfektion von geringen Plasmid-DNA-Mengen (< 56 fmol), verglichen mit den Standardangaben des Invitrogen-Protokolls für die Verwendung von Lipofectamine-2000 (800 ng), war möglich und führte zu einer für die kommenden Expressionsanalysen ausreichenden Expression des Reportergens.
- (2) Der erste Vergleich des CMV-S/MAR-enhaltenden Minicircles mit dem korrespondierenden Parentalplasmid (vgl. Abb. 3-7), zeigte bezüglich der mittleren Expression drei Tage nach der Transfektion eine deutliche Überlegenheit des Minicircles (mehr als 100 %) gegenüber dem Parentalplasmid.

3.4 Vergleiche von Minicircles und Parentalplasmiden in der transienten Expressionsphase

3.4.1 Experimentelles Set-Up

Insgesamt wurden sowohl für das Reportergen Gaussia Luciferase (GLuc) als auch für *destabilized* EGFP (d2EGFP) jeweils drei Minicircles und drei Parentalplasmide untereinander verglichen (Abb. 3-8).

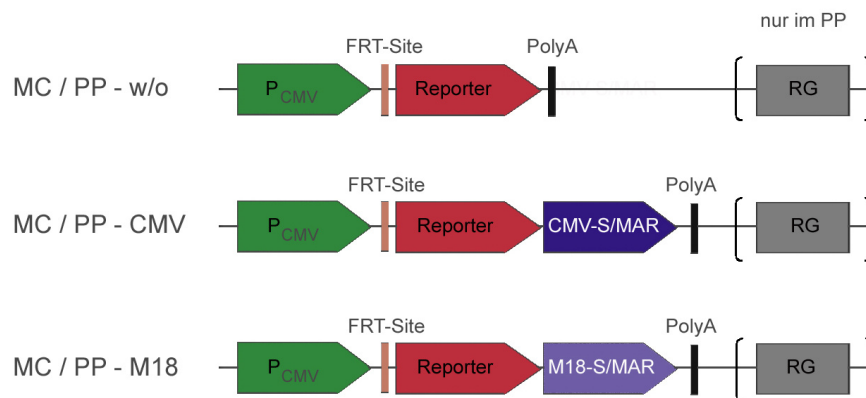


Abb. 3-8: Schematische Darstellung der für die Expressionsanalysen verwendeten Minicircles und Parentalplasmide.

Die für die Expressionsanalysen verwendeten Minicircles und Parentalplasmide sind schematisch und in linearer Form dargestellt. Die enthaltenen Elemente der Expressionseinheit sind: [CMV-Promotor (P_{CMV})] – [FRT-site] – [Reportergen (GLuc oder d2EGFP)] – [(S/MAR)] – [PolyA-site]. Das Rückgrat (RG) ist nur in den Parentalplasmiden enthalten und fehlt bei den Minicircles. Es besteht aus: [CMV-Promotor] – [FRT-site] – [Ampicillin-Resistenzgen] – [pUC ori].

Die Minicircles und Parentalplasmide enthielten entweder das CMV-S/MAR- oder das M18-S/MAR-Element stromabwärts des Reportergens oder sie enthielten keine S/MAR (entsprechende Bezeichnung: MC/PP-CMV, MC/PP-M18, MC/PP-w/o).

Die Parentalplasmide waren ausschließlich vom pEpi-Vektortyp. Die Minicircles wurden basierend auf dem pEpi-Vektortyp in *E. coli* EL250-Zellen oder basierend auf dem pAIO-Vektortyp in *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ hergestellt.

Von allen DNA-Molekülen wurde die dominant vorherrschende supercoiled Form aus einem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt und für die Transfektion verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ausschließlich densitometrisch und wurde vor jedem neu durchgeführten Experiment wiederholt. Zwischen den Experimenten wurden die DNA-Präparationen bei 4 °C gelagert.

Basierend auf den aus der Optimierung des Transfektionsprotokolls erhaltenen Daten (vgl. Abschnitt 3.3) war die Transfektion geringer DNA-Mengen (< 50 fmol) möglich, ohne die

Qualität der Expressionsvergleiche negativ zu beeinflussen. Aufgrund der geringen Abhängigkeit der mittleren d2EGFP-Expression von der transfizierten DNA-Massenmenge wurden Parentalplasmide und Minicircles äquimolar (jeweils 46 fmol) transfiziert. Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte in 24-Loch-Platten mittels Lipofectamine-2000 (2 µg) und wurde teilweise in Duplikaten durchgeführt. Die Massenmengen wurden nicht durch Zugabe „neutraler“ DNA zu den Minicircle-Ansätzen angeglichen, da ein Einfluss der zusätzlichen DNA auf die Expressionsanalysen nicht ausgeschlossen werden konnte. Hinsichtlich erhöhter Transfektionseffizienzen konnte zudem kein positiver Effekt erwartet werden (Markus Heine, persönliche Mitteilung).

Eine Übersicht aller Parameter für die Expressionsvergleiche ist in Tab. 3-4 aufgeführt.

Tab. 3-4: Übersicht über die Eigenschaften und Transfektionsparameter der Minicircles und Parentalplasmide mit den Reportern GLuc bzw. d2EGFP.

Zeichenerklärung: + enthalten, - nicht enthalten.

	Reporter GLuc					
	MC _G -CMV	MC _G -M18	MC _G -w/o	PP _G -CMV	PP _G -M18	PP _G -w/o
Größe [kb]	2,2	2,4	1,7	5,1	5,3	4,6
CMV-S/MAR d/s GLuc-Gen	+	-	-	+	-	-
M18-S/MAR d/s GLuc-Gen	-	+	-	-	+	-
transf. DNA-Menge [fmol]	46	46	46	46	46	46
transf. DNA-Menge [ng]	67	73	50	154	160	137

	Reporter d2EGFP					
	MC _d -CMV	MC _d -M18	MC _d -w/o	PP _d -CMV	PP _d -M18	PP _d -w/o
Größe [kb]	2,5	2,7	2,0	5,4	5,6	4,9
CMV-S/MAR d/s GLuc-Gen	+	-	-	+	-	-
M18-S/MAR d/s GLuc-Gen	-	+	-	-	+	-
transf. DNA-Menge [fmol]	46	46	46	46	46	46
transf. DNA-Menge [ng]	77	82	60	164	169	147

3.4.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

In drei unabhängigen Experimenten wurde die Transfektionseffizienz der Minicircles und Parentalplasmide mit dem Reporter d2EGFP einen Tag nach der Transfektion bestimmt (% *Gated 1* d p. T., Abb. 3-9).

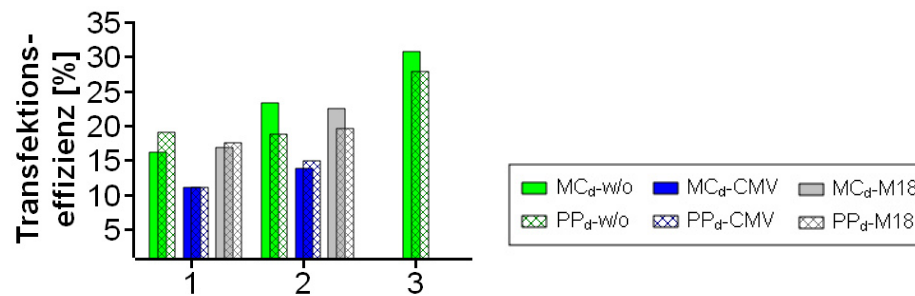


Abb. 3-9: Transfektionseffizienz von Minicircles und Parentalplasmiden.

Übersicht der in drei unabhängigen Experimenten (Beschriftung der Abszisse: 1 – 3) bestimmten Transfektionseffizienzen für sechs d2EGFP-Vektoren bei äquimolarer Transfektion (46 fmol) von HEK293-Zellen in 24-Loch-Platten. Die Messung des Anteils d2EGFP-exprimierender Zellen (% Gated) erfolgte einen Tag nach der Transfektion.

Minicircles und Parentalplasmide unterschieden sich nicht systematisch in der Transfektionseffizienz (Abb. 3-9): teilweise war die Transfektionseffizienz beim Minicircle, teilweise beim Parentalplasmid höher.

Allerdings senkte das Vorhandensein des CMV-S/MAR-Elements im Vektor die Transfektionseffizienz um durchschnittlich etwa 6,5 %.

3.4.3 Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen an den Tagen 1 bis 4 p. T.

Der Anteil exprimierender Zellen (% Gated) wurde im Verlauf der Expressionsstudien nur für den Reporter d2EGFP bestimmt (Abb. 3-10). Für den Reporter GLuc war dieser Parameter nicht ohne Weiteres zugänglich.

Die transfizierten HEK293-Zellen wurden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion durchflusszytometrisch vermessen. Der % Gated-Wert an Tag 1 p. T. entspricht der in dieser Arbeit bestimmten Transfektionseffizienz (vgl. 3.4.2).

Die Transfektionseffizienz des CMV-S/MAR-haltigen Minicircles war in dem dargestellten Experiment etwa 9 % geringer als die der beiden anderen Minicircles. Bei den entsprechenden Parentalplasmiden betrug der Unterschied 4 – 5 % (Abb. 3-10 a, b).

Der Anteil exprimierender Zellen wurde gemäß Abb. 3-10 bei allen Transfektionsansätzen bis Tag 3 innerhalb von jeweils 24 h etwa halbiert (Faktoren 1,7 bis 2,6). Danach blieb der % Gated-Wert relativ konstant.

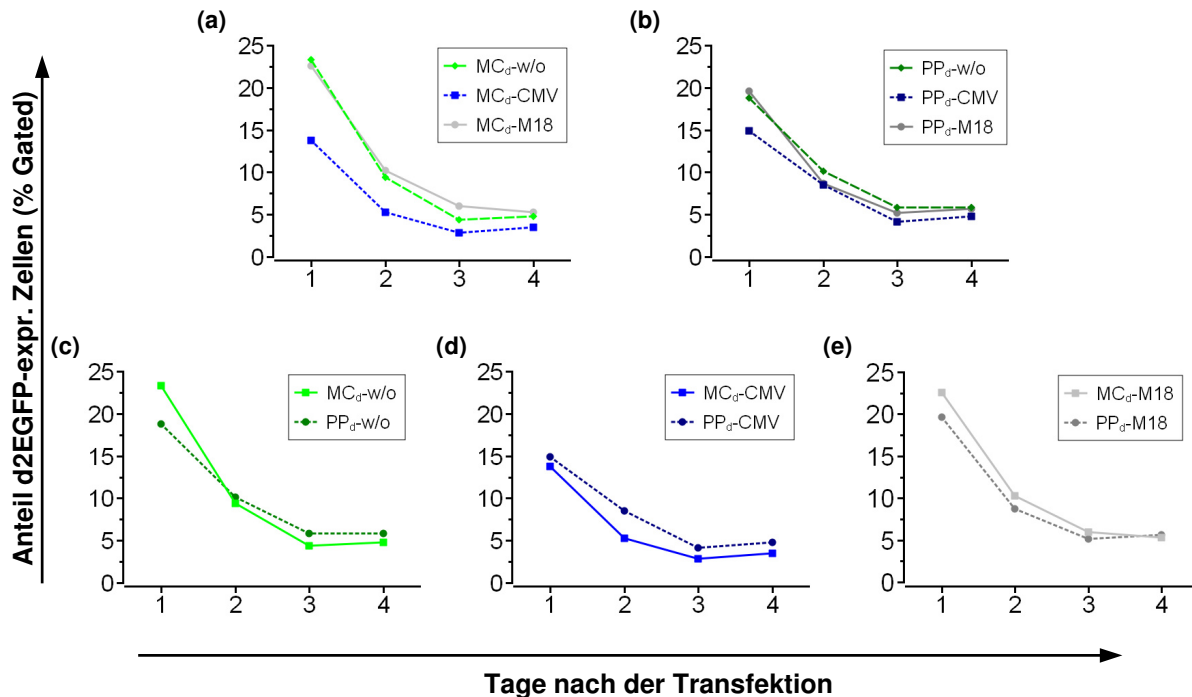


Abb. 3-10: Anteil d2EGFP-exprimierender HEK293-Zellen (% Gated) zum Vergleich zwischen Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion.

Repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten sind dargestellt. HEK293-Zellen wurden mit jeweils 46 fmol Vektor-DNA in einer 24-Loch-Platte transfiziert. Vergleichend zusammengefasst sind (a) die drei Minicircles, (b) die drei Parentalplasmide, (c) MC und PP ohne S/MAR, (d) MC und PP mit CMV-S/MAR, (e) MC und PP mit M18-S/MAR.

Es konnten keine relevanten Unterschiede zwischen Minicircles und Parentalplasmiden bzw. zwischen S/MAR-enthaltenden und S/MAR-losen Vektoren hinsichtlich des Verlaufs des Anteils d2EGFP-exprimierender Zellen nachgewiesen werden.

3.4.4 Expressionsvergleich an den Tagen 1 bis 4 p. T.

Die GLuc- und d2EGFP-Expression der jeweils sechs transfizierten Minicircles und Parentalplasmide wurde an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion von HEK293-Zellen gemessen und untereinander verglichen (Abb. 3-11, Abb. 3-13).

Die Daten wurden derart zusammengefasst, dass jeder Minicircle direkt mit dem korrespondierenden Parentalplasmid verglichen werden konnte (Abb. 3-11), bzw. es wurde ein Vergleich der Minicircles sowie der Parentalplasmide untereinander dargestellt (Abb. 3-13).

Vergleich der Minicircles und korrespondierenden Parentalplasmide (Abb. 3-11, Abb. 3-12):

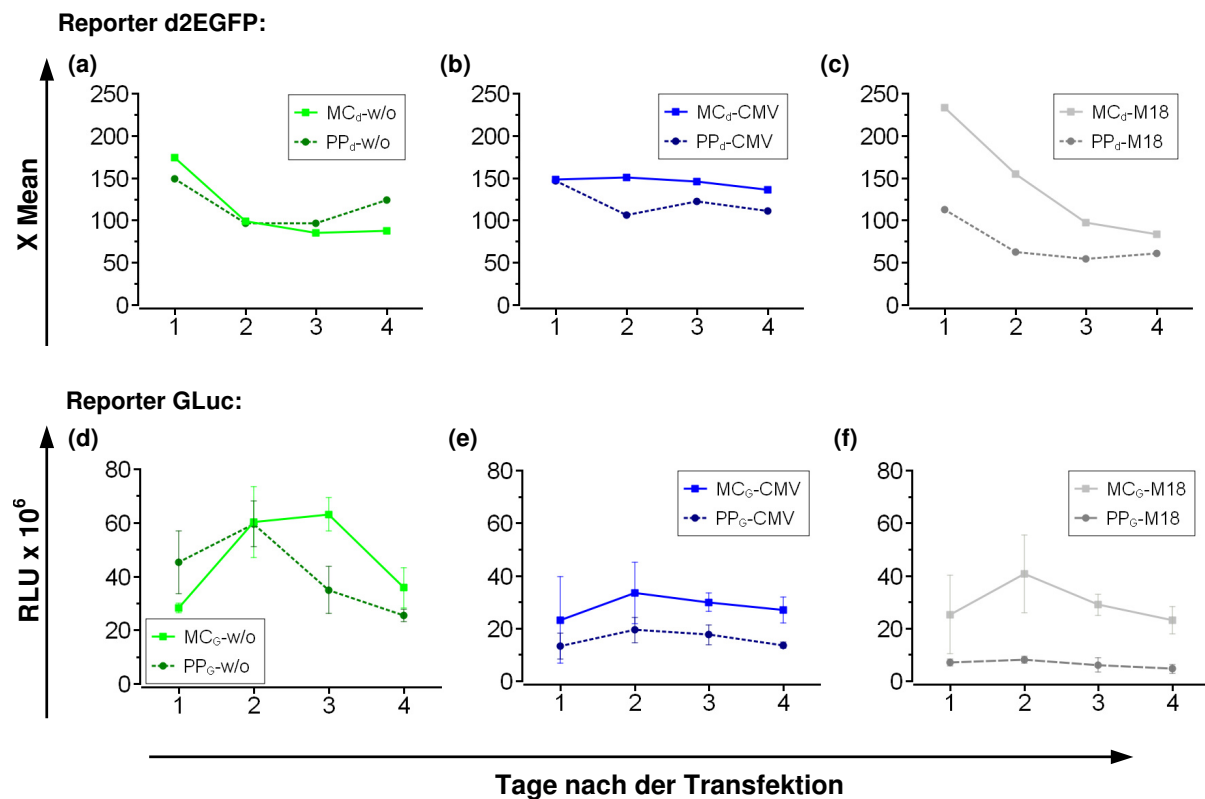


Abb. 3-11: Expressionsvergleich zwischen Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion.

HEK293-Zellen wurden mit jeweils 46 fmol Vektor-DNA in einer 24-Loch-Platte transfiziert. (a) – (c): Repräsentative Ergebnisse der Messung der mittleren Expression (X Mean-Werte) aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Transfiziert wurden sechs unterschiedliche d2EGFP-Expressionsplasmide (drei Minicircles, drei korrespondierende Parentalplasmide); (d) – (f): Dargestellt sind Mittelwerte der GLuc-Expression ($RLU \cdot 10^6$) mit Fehlerindikatoren, die in drei unabhängigen Experimenten bestimmt wurden. (Ausnahme: Minicircle ohne S/MAR MC_G -w/o zwei Experimente). Transfiziert wurden sechs unterschiedliche GLuc-Expressionsplasmide (drei Minicircles, drei korrespondierende Parentalplasmide). Vergleichend zusammengefasst sind (a) und (d): MC und PP ohne S/MAR, (b) und (e): MC und PP mit CMV-S/MAR, (c) und (f): MC und PP mit M18-S/MAR.

Die mittlere d2EGFP-Expressionshöhe (X Mean) bei Transfektion von HEK293-Zellen mit d2EGFP-Expressionsvektoren wies im Gegensatz zu dem oben dargestellten Anteil exprimierender Zellen (Abb. 3-10, S. 67) teilweise deutliche Unterschiede zwischen Minicircles und Parentalplasmiden sowie zwischen S/MAR-enthaltenden und S/MAR-losen Vektoren auf (Abb. 3-11 a – c). Die Expressionsverläufe der beiden verwendeten Reportersysteme zeigten darüber hinaus trotz unterschiedlicher Messparameter Gemeinsamkeiten.

Ohne Vorhandensein eines S/MAR-Elements im Vektor war die Expression von Minicircle und Parentalplasmid über den Messzeitraum von vier Tagen ähnlich (Abb. 3-11 a und d). Das Ansteigen des Signals des d2EGFP-Parentalplasmids ohne S/MAR ab Tag 2 war nicht reproduzierbar (Abb. 3-11 a).

Das CMV-S/MAR-Element bewirkte beim d2EGFP-Reportersystem reproduzierbar eine Stabilisierung des Expressionssignals im Minicircle und im Parentalplasmid über einen Zeitraum von vier Tagen. Ab Tag 2 bzw. 3 war darüber hinaus die Expression im Minicircle-Ansatz bei beiden Reportersystemen höher als diejenige des Parentalplasmid-Ansatzes (Abb. 3-11 b und e; Faktor $\sim 1,7 - 2$), obwohl in beiden Molekülen jeweils dieselbe Expressionseinheit vorhanden ist.

Das M18-S/MAR-Element führte bei beiden Reportersystemen zu einer deutlichen Steigerung (teilweise $> 100\%$) der Expression des Minicircles gegenüber dem korrespondierenden Parentalplasmid (Abb. 3-11 c und f, maximal 400 % Erhöhung). Dieser Effekt erstreckte sich über die gesamte Messdauer von vier Tagen, die Differenz zwischen Minicircle und Parentalplasmid nahm im Verlauf der Messung jedoch allmählich ab.

Sowohl die GLuc- als auch die d2EGFP-Expression waren beim Minicircle gegenüber dem korrespondierenden Parentalplasmid gemäß Abb. 3-11 lediglich dann erhöht, wenn ein S/MAR-Element im Vektor enthalten war. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhalts wurden beispielhaft für das d2EGFP-Reportersystem die Quotienten aus den *X Mean*-Werten der Minicircles und den *X Mean*-Werten der korrespondierenden Parentalplasmide gebildet (Abb. 3-12).

Ein Quotient mit dem Wert 1 bedeutet hier, dass die mittlere Expression von Minicircle und Parentalplasmid identisch ist. Dies war beim Expressionsvergleich ohne S/MAR nahezu erfüllt (Abb. 3-12, Quotient ~ 1). Folglich war kaum ein Unterschied zwischen der Expressionshöhe bei Transfektion mit MC_d-w/o und PP_d-w/o nachzuweisen.

Nimmt der Quotient einen Wert größer als 1 an, so ist die Expression des Minicircles höher als die des Parentalplasmids. Dieser Sachverhalt lag sowohl bei Verwendung des CMV- als auch des M18-S/MAR-Elements vor. Dabei war die Differenz zwischen mittlerer Expression des Minicircles und der des Parentalplasmids bei Verwendung des M18-S/MAR-Elements am ausgeprägtesten (teilweise Quotient > 2).

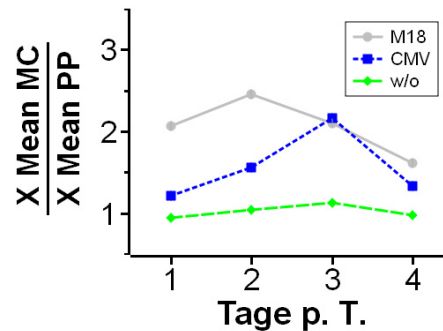


Abb. 3-12: Expressionsvergleich zwischen d2EGFP-exprimierenden Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion (Quotientenbildung).

Die Quotienten der X Mean-Werte eines Minicircles und des korrespondierenden Parentalplasmids sind in Abhängigkeit von der Zeit nach der Transfektion für die MC/PP-Paare mit CMV-S/MAR, mit M18-S/MAR oder ohne S/MAR dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Vergleich der Minicircles und der Parentalplasmide untereinander (Abb. 3-13):

Die Expressionsmessungen der drei Minicircles und der drei Parentalplasmide wurden jeweils noch einmal direkt vergleichend zusammengefasst (Abb. 3-13). Dabei wurden nicht nur Unterschiede zwischen den S/MAR-enthaltenden und S/MAR-losen Vektoren, sondern auch zwischen den beiden verwendeten Reportersystemen deutlich. Letztere basieren auch auf verschiedenen Eigenschaften der beiden Systeme (vgl. Abschnitt 2.3.3.3). Im Gegensatz zur Messung der GLuc-Expression stellt d2EGFP einen Transkriptionsmarker dar (geringe Halbwertszeit). Zudem wird bei der durchflusszytometrischen Messung der Anteil exprimierender Zellen insofern berücksichtigt, als dass die mittlere Expression lediglich von d2EGFP-positiven Zellen bestimmt wird. Eine solche ‚Normierung‘ fand bei der Vermessung der Expression des sehr stabilen Reporters GLuc (vgl. Abschnitt 3.2) nicht statt.

Die GLuc-Expression der Minicircles und Parentalplasmide wies jeweils ein Expressionsmaximum an den Tagen 2 bzw. 3 nach der Transfektion auf (Abb. 3-13 c, d).

Beim Minicircle ohne S/MAR war die GLuc-Expression an den Tagen 2 und 3 nach der Transfektion etwa 1,6 bis 2,9 mal höher als bei den beiden S/MAR-enthaltenden Minicircles. An Tag 4 fiel die GLuc-Expression ohne S/MAR stark ab, so dass alle drei Minicircles dann ein ähnliches Expressionsniveau aufwiesen (Abb. 3-13 c).

Die Expression beider S/MAR-enthaltenden GLuc-Minicircles verlief nahezu identisch.

Ein ähnliches Bild ergab der Vergleich der GLuc-exprimierenden Parentalplasmide untereinander (Abb. 3-13 d). Auch hier war die Expressionshöhe beim Parentalplasmid ohne S/MAR am höchsten, fiel jedoch ab Tag 3 nach der Transfektion deutlich ab.

Der Verlauf der beiden S/MAR-enhaltenden Parentalplasmide war qualitativ ähnlich (Maximum an Tag 2), die Expressionshöhe des Parentalplasmids mit CMV-S/MAR war jedoch etwa doppelt so hoch wie die des Parentalplasmids mit M18-S/MAR (Abb. 3-13 d).

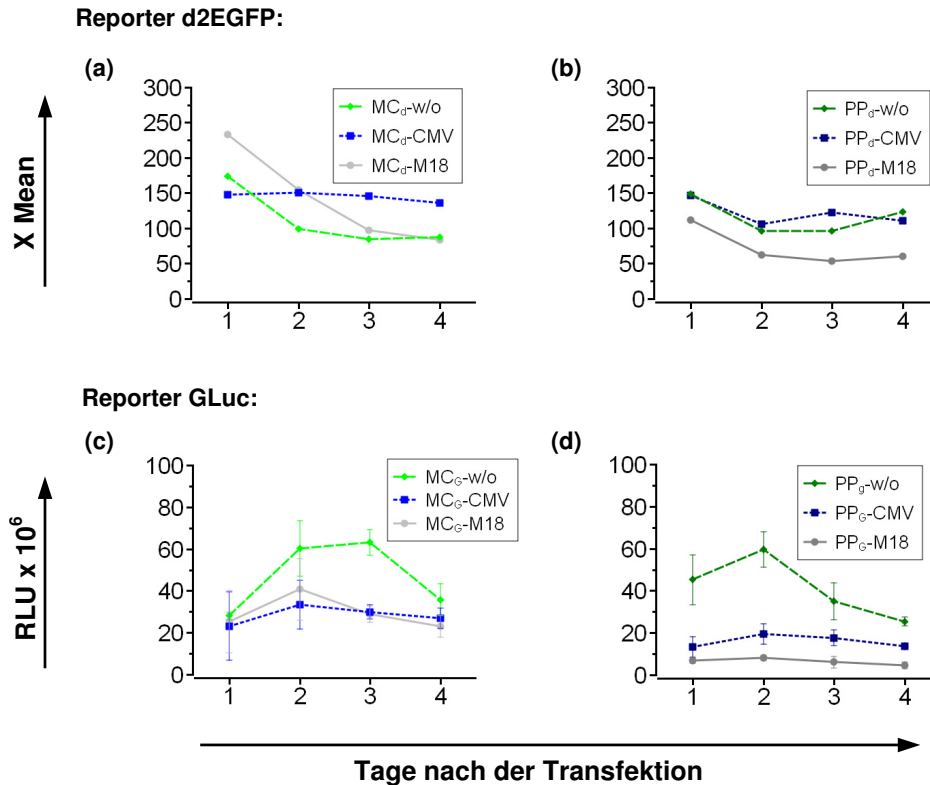


Abb. 3-13: Expressionsvergleich zwischen S/MAR-haltigen und S/MAR-losen Minicircles und Parentalplasmiden an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion.

HEK293-Zellen wurden mit jeweils 46 fmol Vektor-DNA in einer 24-Loch-Platte transfiziert. **(a) und (b):** Repräsentative Ergebnisse der Messung der mittleren Expression (X Mean-Werte) aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Transfiziert wurden sechs unterschiedliche d2EGFP-Expressionsplasmide (drei Minicircles, drei korrespondierende Parentalplasmide); **(c) und (d):** Dargestellt sind Mittelwerte der GLuc-Expression ($RLU \cdot 10^6$) mit Fehlerindikatoren, die in drei unabhängigen Experimenten bestimmt wurden (Ausnahme: Minicircle ohne S/MAR MC_G -w/o zwei Experimente). Transfiziert wurden sechs unterschiedliche GLuc-Expressionsplasmide (drei Minicircles, drei korrespondierende Parentalplasmide). Vergleichend zusammengefasst sind (a) und (c): die drei Minicircles, (b) und (d): die drei Parentalplasmide.

Die mittlere Expression der d2EGFP-exprimierenden Minicircles war, verglichen mit den GLuc-Daten, grundlegend anders (Abb. 3-13 a und b).

Das Vorhandensein des M18-S/MAR-Elements führte im d2EGFP-Minicircle zu einer deutlichen Steigerung des 1 d-Signals (30 % gegenüber MC ohne S/MAR, fast 40 % gegenüber MC mit CMV-S/MAR), wenngleich die Expression bereits an Tag 2 auf das Niveau des Minicircles mit CMV-S/MAR sank und an Tag 4 das Niveau des Minicircles ohne S/MAR erreicht hatte (Abb. 3-13 a).

Die Stabilisierung des Expressionsniveaus im Minicircle mit CMV-S/MAR konnte bei den beiden anderen Minicircles nicht nachgewiesen werden. Daher ist diese Stabilisierung spezifisch auf das CMV-S/MAR-Element im Minicircle-Kontext zurückzuführen.

Während beim Reporter GLuc der Minicircle ohne S/MAR die höchste Expression aufwies, war bei den d2EGFP-exprimierenden Minicircles die Verwendung eines S/MAR-Elements für eine möglichst hohe mittlere Expression notwendig.

Dem gegenüber verliefen die *X Mean*-Signale der d2EGFP-exprimierenden Parentalplasmide ohne S/MAR und mit CMV-S/MAR nahezu identisch (Abb. 3-13 b). Die mittlere Expression war bei beiden Plasmiden mindestens 1,3-mal höher als bei dem Parentalplasmid mit M18-S/MAR.

Insgesamt konnten sowohl Expressionsunterschiede zwischen Minicircles und Parentalplasmiden, als auch zwischen S/MAR-enthaltenden und S/MAR-losen Plasmiden dargestellt werden. Die beiden Reportersysteme lieferten dabei unterschiedliche Ergebnisse. Bei Verwendung des GLuc-Reportersystems war die Expression der DNA-Moleküle ohne S/MAR (sowohl Minicircle als auch Parentalplasmid) in der transienten Phase höher als die Expression derjenigen mit CMV- und M18-S/MAR. Hier wurde allerdings die gesamte Expression eines transfizierten Lochs gemessen, ungeachtet der Transfektionseffizienz.

Für eine möglichst hohe mittlere d2EGFP-Expression erwies sich die Verwendung eines der beiden S/MAR-Elemente als vorteilhaft. Im Besonderen wurde anhand der Daten eine expressionsstabilisierende Wirkung des CMV-S/MAR-Elements in der transienten Phase nachgewiesen. Darüber hinaus wurde eine initiale Expressionssteigerung durch Verwendung des M18-S/MAR-Elements im d2EGFP-Minicircle gezeigt.

Für beide Reportersysteme wurde im Rahmen der Expressionsanalysen ein Sachverhalt offensichtlich: die Expression des Minicircles war gegenüber dem entsprechenden Parentalplasmid nur dann erhöht, wenn ein S/MAR-Element enthalten war (Abb. 3-11, Abb. 3-12). Zu beachten ist hierbei, dass sowohl der Minicircle als auch das korrespondierende Parentalplasmid im Bereich der Expressionseinheit jeweils dieselbe Sequenz aufweisen.

3.5 Anwendung des CMV-S/MAR-Elements in nicht pEpi-basierten Plasmiden

Mit einem auf dem pEpi-Vektortyp basierenden Minicircle wurde gezeigt, dass das CMV-S/MAR-Element in der transienten Phase das Expressionsniveau stabilisieren kann (Abschnitt 3.4.4). Um die Eigenschaften und den Einfluss des CMV-S/MAR-Elements auf die transiente Phase weitergehend zu untersuchen, wurde es im Rahmen dieser Arbeit in kommerzielle, nicht pEpi-basierte Plasmide kloniert.

Die verwendeten Plasmide waren zum Einen pCMV-GLuc (Fa. *New England Biolabs*), ein Vektor für konstitutive GLuc-Expression in Säugerzellen, zum Anderen pCMVd2EGFP-basic (Qiao, 2009), ein auf dem Vektor pd2EGFP-Basic (Fa. Clontech) basierendes Konstrukt für eine effiziente d2EGFP-Expression. Gemäß Hersteller kann pCMV-GLuc als Positivkontrolle in Transfektionsexperimenten verwendet werden und ist aufgrund der hohen Signalintensität insbesondere für Assays mit niedrigen Zellzahlen geeignet. Die Sekretion vereinfacht darüber hinaus die Sammlung von Expressionsdaten zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Basisvektor pd2EGFP-Basic erlaubt die Messung einer Expressionskinetik und den Vergleich unterschiedlicher Promotoren, die jeweils in das Konstrukt einkloniert werden können.

Für die in dieser Arbeit durchzuführenden Expressionsuntersuchungen wurde das CMV-S/MAR-Element in die Grundkonstrukte pCMV-GLuc und pCMVd2EGFP-basic sowohl stromabwärts des Reportergens (analog zu pEpi-Plasmiden), als auch stromaufwärts des CMV-Promotors kloniert (Abb. 3-14).

HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mittels Lipofectamine-2000 mit den Plasmiden A bis F (Abb. 3-14, für A vgl. Abb. 3-8: PP-w/o) transfiziert. Zum Vergleich wurden diejenigen pEpi-Plasmide ebenfalls transfiziert, bei denen die Expressionseinheiten analog zu denen der Plasmide B, C und F aus Abb. 3-14 aufgebaut waren.

Für die hier vorgenommenen Expressionsanalysen wurden nicht, wie üblich, äquimolare Mengen jedes Plasmids transfiziert. Die Größenunterschiede der pCMV-basierten Plasmide bewegten sich etwa zwischen 15 % und 20 %. In dieser Größenordnung (~ 200 fmol) wurde eine zu vernachlässigende Abhängigkeit der Expression von der transfizierten DNA-Menge erwartet (vgl. Abb. 3-5, S. 61, Ansätze A und B). Daher wurde je Transfektionsansatz eine konstante Menge von 800 ng DNA mit 2 µg Lipofectamine-2000 transfiziert (gemäß Protokoll der Fa. Invitrogen).

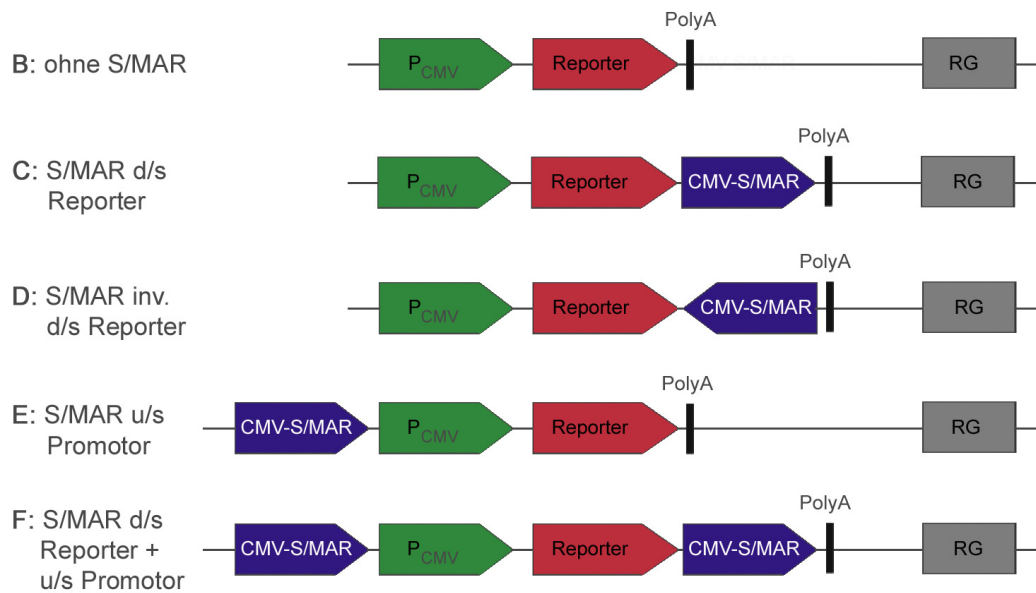


Abb. 3-14: Schematische Darstellung der pCMV-GLuc- und pCMVd2EGFP-basic-Plasmide mit CMV-S/MAR.

Dargestellt sind die für die Expressionsanalysen verwendeten Varianten des pCMV-GLuc- bzw. pCMVd2EGFP-basic-Plasmids schematisch und in linearer Form. Die enthaltenen Elemente der Expressionseinheit sind: ([CMV-S/MAR]) – [CMV-Promotor (P_{CMV})] – [Reporter (GLuc oder d2EGFP)] – ([CMV-S/MAR]) – [PolyA-site].

Das Rückgrat (RG) ist beim Grundkonstrukt pCMV-GLuc wie folgt zusammengesetzt: [SV40-Promotor] – [Neomycin-Resistenzgen] – [pMB1 ori] – [Ampicillin-Resistenzgen]. Beim Grundkonstrukt pCMVd2EGFP-basic besteht das Rückgrat (RG) aus: [pUC ori] – [Ampicillin-Resistenzgen] – [f1 ori]. Die Plasmide sind mit B bis F durchnummeriert. A steht im Folgenden für die in Abb. 3-8 dargestellte pEpi-Variante PP-w/o. Diese ist bezüglich der Expressionseinheit analog zu B aufgebaut, das Rückgrat besteht jedoch aus: [CMV-Promotor] – [FRT-site] – [Ampicillin-Resistenzgen] – [pUC ori]. Abkürzungen: d/s stromabwärts, inv. Invertiert, RG Rückgrat des Plasmids, u/s stromaufwärts.

Die beiden Reportersysteme werden im Folgenden getrennt voneinander behandelt, da sie teilweise grundlegend verschiedene Ergebnisse hervorbrachten (vgl. d2EGFP Transfektionsmarker, GLuc Expressionsmarker und Abschnitt 2.3.3).

3.5.1 Verwendung des Reporters GLuc

Die Expressionsanalyse für den Reporter Gaussia Luciferase erfolgte in HEK293-Zellen für die ersten 72 h nach der Transfektion, sowie für die Tage 4 bis 7, 14, 21, 28, 35 und 42 (dann Überstand jeweils aus 24 h) in 24-Loch-Platten. Im gesamten Verlauf der Messungen wurde kein Selektionsdruck auf die transfizierten Zellen ausgeübt.

Der Vergleich von pEpi- und pCMV-basierten Plasmiden, die an unterschiedlichen Stellen das CMV-S/MAR-Element enthielten, ist in Abb. 3-15 dargestellt.

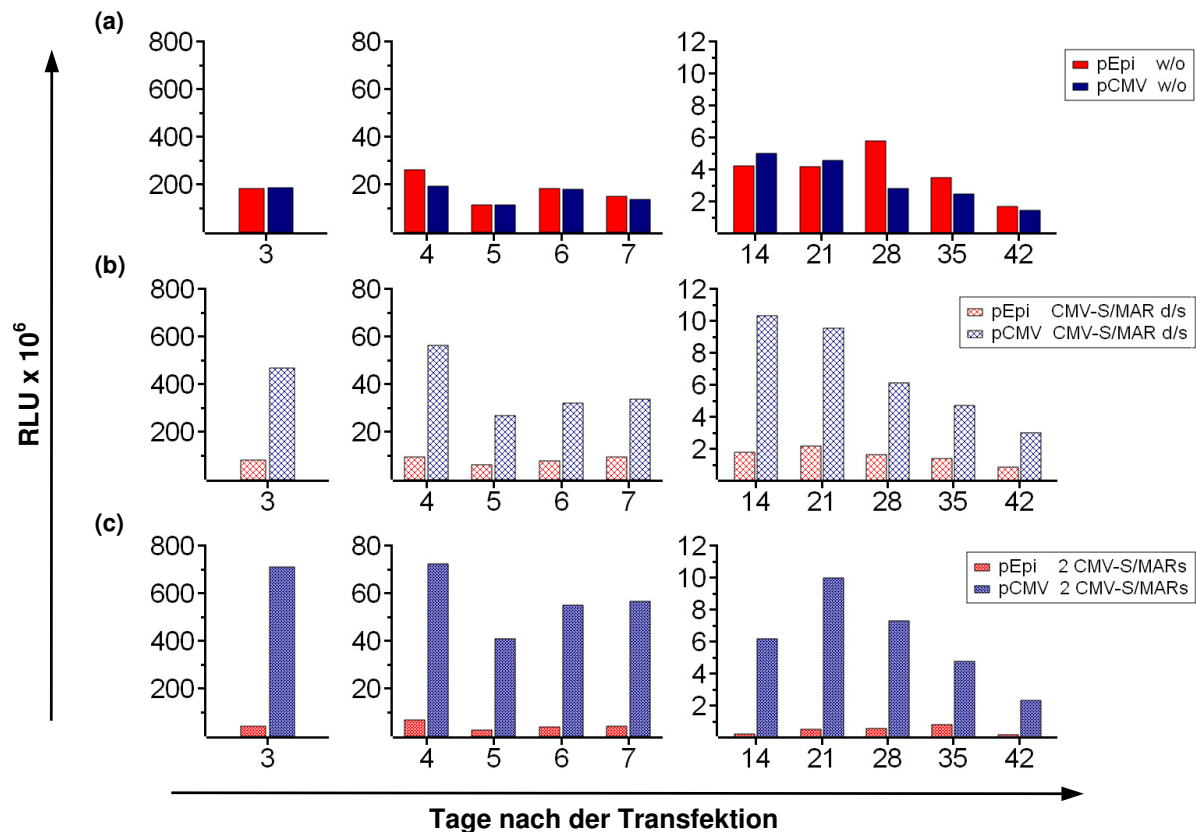


Abb. 3-15: GLuc-Expressionsvergleich zwischen CMV-S/MAR-haltigen pEpi- und pCMV-basierten Vektoren.

HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert. Die zu vermessenden Überstände der HEK293-Zellen wurden jeweils aus 24 h genommen mit Ausnahme der Probe 3 (72 h Überstand). Dargestellt ist die GLuc-Expression ($RLU \cdot 10^6$) in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Probenahme nach der Transfektion (zu beachten ist die unterschiedliche Ordinatenkalierung). Für die auf dem pEpi-Rückgrat basierten Plasmide wird in der Abbildung entsprechend die Abkürzung pEpi verwendet. Im Plasmid pEpi w/o wurde das S/MAR-Element entfernt. Die pCMV-basierten Plasmide sind analog mit pCMV abgekürzt. (a) pEpi und pCMV ohne S/MAR; (b) pEpi und pCMV mit CMV-S/MAR stromabwärts des GLuc-Gens, entsprechend Abb. 3-14, C, S. 75; (c) pEpi und pCMV mit CMV-S/MAR stromabwärts des GLuc-Gens und stromaufwärts des CMV-Promotors, entsprechend Abb. 3-14, F, S. 75. Abkürzungen: d/s stromabwärts, RLU Relative Lichteinheiten, w/o ohne S/MAR.

Während des gesamten Zeitraumes der Messungen (sechs Wochen) verlief die GLuc-Expression der beiden Plasmide pEpi_GLuc (PP_G-w/o, vgl. Abb. 3-8, S. 65) und pCMV-GLuc ohne S/MAR ähnlich (Abb. 3-15 a). Nach sechs Wochen Inkubation war noch etwa ein Zehntel der 4 d-Expression nachweisbar.

War das CMV-S/MAR-Element stromabwärts des GLuc-Gens im Plasmid enthalten, so hatte dies Einfluss auf die Expressionshöhe bei beiden Konstrukten, pEpi und pCMV (Abb. 3-15 b). Die Expression, die nach 72 h Inkubation mit dem pEpi-basierten Vektor gemessen wurde, betrug nur etwa die Hälfte der Expression des äquivalenten Vektors ohne S/MAR. Auch nach sechs Wochen Inkubation war dieses Verhältnis noch konsistent. Im

Gegensatz dazu führte das CMV-S/MAR-Element im pCMV-basierten Vektor zu einer Steigerung der Expression um mehr als das Doppelte, verglichen mit den Vektoren ohne S/MAR. Auch dieses Verhältnis blieb über sechs Wochen nahezu bestehen.

Das zusätzliche Einfügen des CMV-S/MAR-Elements stromaufwärts des CMV-Promotors führte zu noch ausgeprägteren Differenzen (Abb. 3-15 c). Die Expressionshöhe lag bei dem pEpi-basierten Vektor nur noch bei 10 – 20 % des Wertes des Kontrollplasmids ohne S/MAR. Im pCMV-basierten Vektor hingegen war die Expression bis Tag 7 nach der Transfektion um das drei- bis vierfache gesteigert, verglichen mit pCMV-GLuc. Anschließend fiel das Signal allerdings unverhältnismäßig stark ab, so dass nach sechs Wochen Inkubation kaum noch ein Unterschied zwischen den Transfektionen mit den pCMV-Konstrukten mit einem oder zwei CMV-S/MARs bestand.

Die unterschiedlichen Expressionshöhen der ersten 72 h, die bei Transfektion mit fünf pCMV-GLuc-Konstrukten gemessen wurden, sind prozentual bezogen auf den Vektor pCMV-GLuc ohne S/MAR in Abb. 3-16 dargestellt.

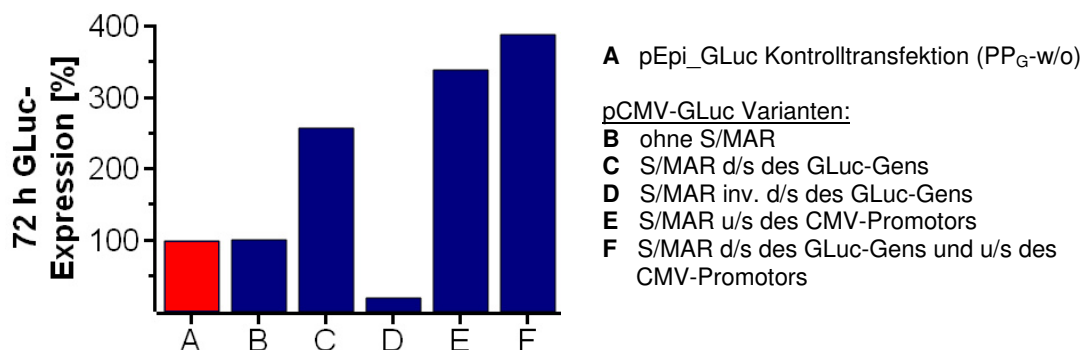


Abb. 3-16: Einfluss des CMV-S/MAR-Elements in pCMV-GLuc-Plasmiden auf die Expression in den ersten 72 h nach der Transfektion.

HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert. Die zu vermessenden Überstände der HEK293-Zellen wurden aus den ersten 72 h nach der Transfektion genommen. Das CMV-S/MAR-Element war entsprechend Abb. 3-14, S.75 stromabwärts (d/s) des GLuc-Gens (Ansatz D invertiert) und / oder stromaufwärts (u/s) des CMV-Promotors inkloniert. Die Expressionshöhe aller Varianten wurde auf den Wert des Ansatzes B normiert.

Die Expression des pEpi_GLuc Kontrollplasmids ohne S/MAR (PP_G-w/o) war in den ersten 72 h nach der Transfektion nahezu identisch mit der Expression des pCMV-GLuc-Plasmids (Abb. 3-16).

Das Einfügen des CMV-S/MAR-Elements stromabwärts des GLuc-Gens führte zu einer etwa 2,5-fachen Steigerung der Expression. Eine Änderung der Orientierung des S/MAR-Elements an dieser Position führte wiederum zu einer Senkung der Expression auf 18 %

(bezogen auf pCMV-GLuc) bzw. auf 7 % (bezogen auf das Plasmid mit der S/MAR in der ursprünglichen Orientierung). In einem analog durchgeführten pEpi-Transfektionsexperiment konnte hingegen stromaufwärts des CMV-Promotors über sieben Tage keine Abhängigkeit der Expression von der Orientierung des CMV-S/MAR-Elements festgestellt werden (Abb. 3-17).

Die Ansätze E und F, in denen das CMV-S/MAR-Element stromaufwärts des CMV-Promotors bzw. zwei CMV-S/MARs enthalten waren, wiesen eine um etwa 240 % bis fast 300 % gesteigerte Expression, verglichen mit dem pCMV-GLuc-Vektor ohne S/MAR, auf (Abb. 3-16).

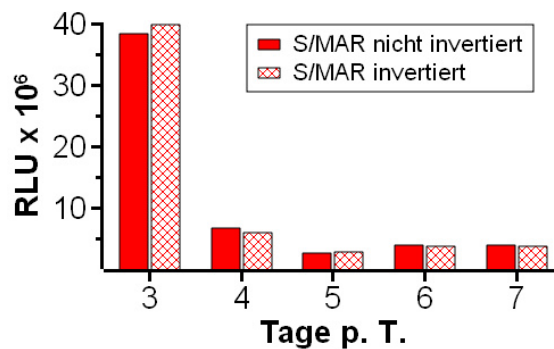


Abb. 3-17: Einfluss der Orientierung des CMV-S/MAR-Elements stromaufwärts des CMV-Promotors auf die Expressionshöhe in der transienten Phase.

Dargestellt ist ein GLuc-Expressionsvergleich zwischen zwei pEpi-basierten Plasmiden mit CMV-S/MAR-Element stromabwärts des GLuc-Gens und invertiert bzw. nicht-invertiert stromaufwärts des CMV-Promotors. HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert. Die zu vermessenden Überstände der HEK293-Zellen wurden jeweils aus 24 h genommen mit Ausnahme der Probe 3 (72 h Überstand).

Zusammengefasst bewirkte das CMV-S/MAR-Element im pCMV-GLuc-Plasmid eine Steigerung der Expression um den Faktor 2,5 bis 4 in den ersten 72 h nach der Transfektion. Dabei war die Orientierung der S/MAR stromabwärts des GLuc-Gens (nicht aber stromaufwärts des CMV-Promotors) von enormer Bedeutung. Deren Invertierung führte zu Expressionseinbußen von mehr als 80 % im betrachteten Zeitraum.

Darüber hinaus hatte das CMV-S/MAR-Element im pCMV-GLuc-Plasmid stromaufwärts des CMV-Promotors transient eine ausgeprägtere expressionssteigernde Wirkung als stromabwärts des Reportergens. Als die Variante mit der insgesamt höchsten Expression erwies sich die Verwendung von zwei CMV-S/MAR-Elementen.

3.5.2 Verwendung des Reporters d2EGFP

Die Expressionsanalyse mit dem Reporter d2EGFP erfolgte in HEK293-Zellen an den Tagen 3 bis 7, 14, 35 und 42 nach der Transfektion.

Der gemessene Anteil exprimierender Zellen (% Gated) ist in Abb. 3-18 dargestellt. Abb. 3-19 zeigt die im Rahmen der Expressionsanalyse gemessene mittlere Expression (X Mean).

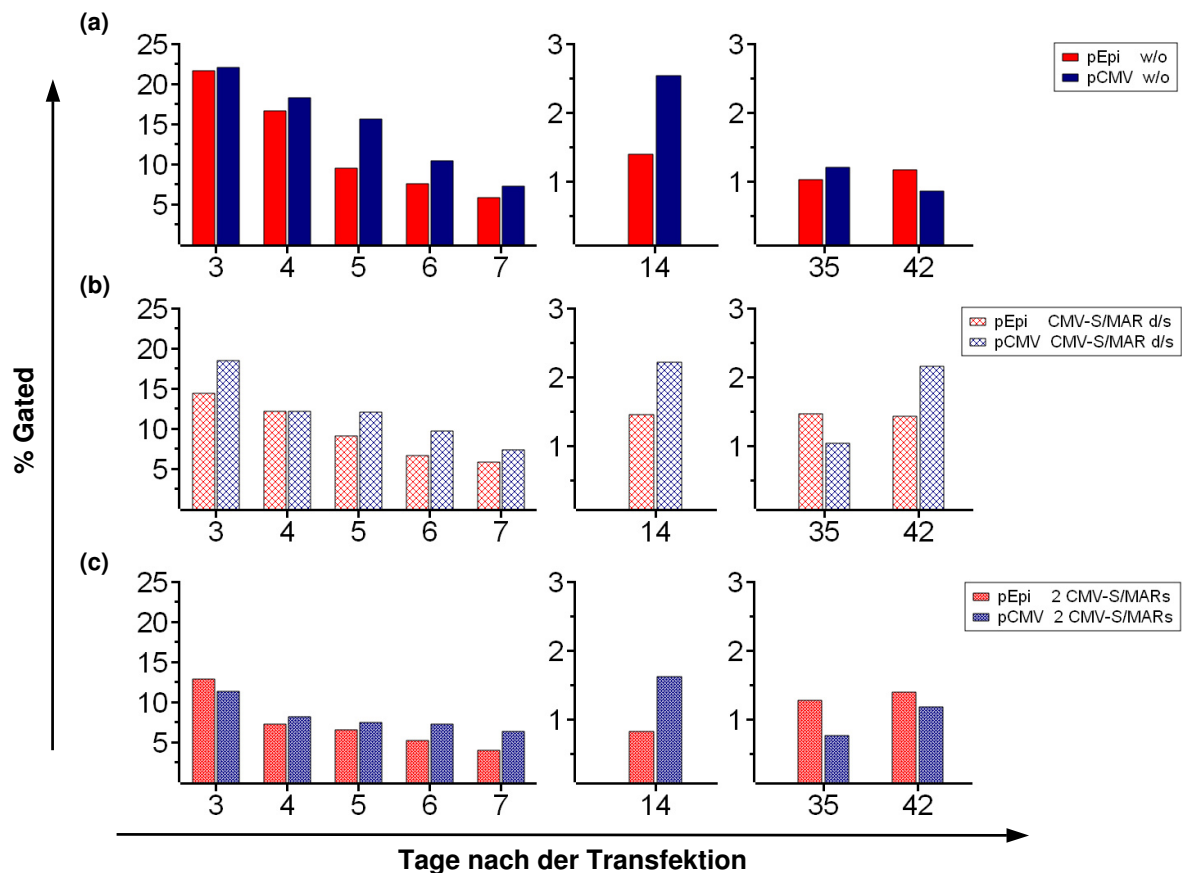


Abb. 3-18: d2EGFP-Expressionsvergleich (hier % Gated) zwischen CMV-S/MAR-haltigen pEpi- und pCMV-basierten Vektoren.

HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert. Dargestellt ist der Anteil exprimierender Zellen in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt nach der Transfektion (zu beachten ist die unterschiedliche Ordinatenkalierung). Für die auf dem pEpi-Rückgrat basierten Plasmide wird in der Abbildung entsprechend die Abkürzung pEpi verwendet. Im Plasmid pEpi w/o wurde das S/MAR-Element entfernt. Die pCMV-basierten Plasmide sind analog mit pCMV abgekürzt. (a) pEpi und pCMV ohne S/MAR; (b) pEpi und pCMV mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens, entsprechend Abb. 3-14, C, S. 75; (c) pEpi und pCMV mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens und stromaufwärts des CMV-Promotors, entsprechend Abb. 3-14, F, S. 75. Abkürzungen: d/s stromabwärts, w/o ohne S/MAR.

Der Anteil exprimierender Zellen verlief bei pEpi- und bei pCMV-Konstrukten ähnlich (Abb. 3-18). Tendenziell war der % Gated-Wert bei den pCMV-Konstrukten ein wenig höher. Der Unterschied bewegte sich jedoch zumeist in einem marginalen Rahmen.

Wie bereits bei der Untersuchung der Transfektionseffizienzen gezeigt wurde (vgl. Abb. 3-9), senkte auch bei diesem Expressionsvergleich das CMV-S/MAR-Element den Anteil exprimierender Zellen um wenige Prozentpunkte (Abb. 3-18 b), verglichen mit den entsprechenden Konstrukten ohne S/MAR. Das Einfügen des zweiten CMV-S/MAR-Elements (Abb. 3-18 c) führte zu einer noch weiteren Absenkung. Nach sechs Inkubationstagen war dieser initiale Effekt allerdings kaum noch nachweisbar. Der Anteil exprimierender Zellen war zum Ende der Expressionsanalyse bei den Ansätzen mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens schließlich etwas höher als bei den Ansätzen ohne S/MAR.

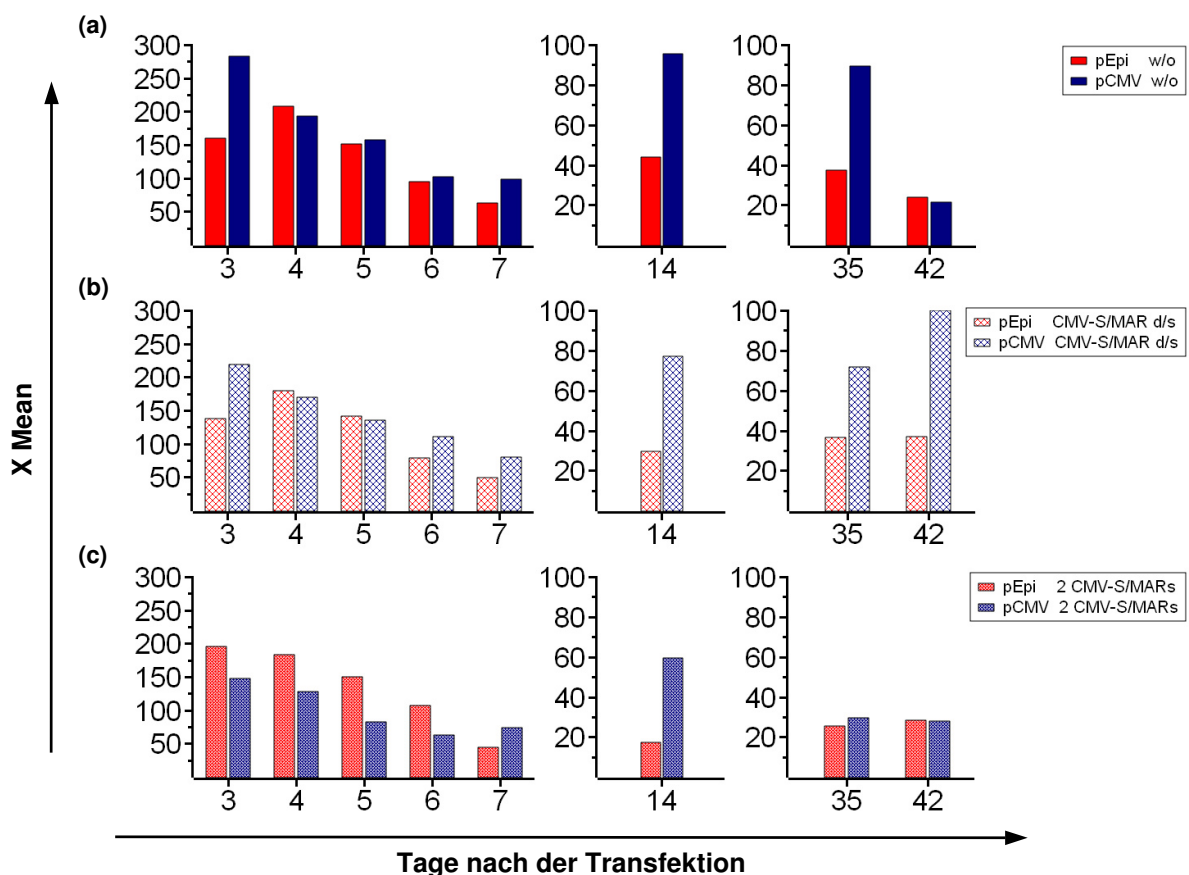


Abb. 3-19: d2EGFP-Expressionsvergleich (hier X Mean) zwischen CMV-S/MAR-haltigen pEpi- und pCMV-basierten Vektoren.

HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert. Dargestellt ist der Anteil exprimierender Zellen in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt nach der Transfektion (zu beachten ist die unterschiedliche Ordinatenkalierung). Für die auf dem pEpi-Rückgrat basierten Plasmide wird in der Abbildung entsprechend die Abkürzung pEpi verwendet. Im Plasmid pEpi w/o wurde das S/MAR-Element entfernt. Die pCMV-basierten Plasmide sind analog mit pCMV abgekürzt. (a) pEpi und pCMV ohne S/MAR; (b) pEpi und pCMV mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens, entsprechend Abb. 3-14, C, S. 75; (c) pEpi und pCMV mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens und stromaufwärts des CMV-Promotors, entsprechend Abb. 3-14, F, S. 75. Abkürzungen: d/s stromabwärts, w/o ohne S/MAR.

Die Unterschiede, die bei der Messung der mittleren Expression auftraten (Abb. 3-19), waren ausgeprägter als jene hinsichtlich des Anteils exprimierender Zellen (Abb. 3-18).

Das *X Mean*-Signal des Plasmids pCMVd2EGFP-basic ohne S/MAR war fast durchgehend höher als das des entsprechenden pEpi_d2EGFP-Plasmids (PP_d-w/o) (Abb. 3-19 a; bis > Faktor 2).

Ein ähnlicher Sachverhalt ist bei den beiden Plasmiden mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens erkennbar (Abb. 3-19 b). Insbesondere ab einer Inkubationszeit von zwei Wochen war die mittlere Expression des pCMV-basierten Plasmids zwei- bis 2,5-mal höher als beim pEpi-basierten Plasmid.

Bei Vorhandensein von zwei CMV-S/MAR-Elementen in den Plasmiden (Abb. 3-19 c) war die Expression bis Tag 6 nach der Transfektion im pEpi-Vektor leicht erhöht, verglichen mit dem analogen pCMV-Vektor. Mit Ausnahme von Tag 14 verliefen anschließend die Signale fast identisch. Insgesamt war die Expressionshöhe des pCMV-Ansatzes mit zwei S/MARs tendenziell geringer als in den Ansätzen mit einem CMV-S/MAR-Element bzw. ohne S/MAR.

Beim direkten Vergleich der unterschiedlichen pCMVd2EGFP-basic-Varianten mit CMV-S/MAR stromabwärts des d2EGFP-Gens bzw. stromaufwärts des CMV-Promotors (Abb. 3-20) konnte keine expressionssteigernde Wirkung des CMV-S/MAR-Elements nachgewiesen werden. Im Gegenteil, sowohl der Anteil exprimierender Zellen als auch die mittlere Expression wurden durch das Einfügen einer oder zwei CMV-S/MARs um mindestens 15 % gesenkt.

Die Änderung der Orientierung des CMV-S/MAR-Elements stromabwärts des d2EGFP-Gens führte, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei den pCMV-GLuc-Varianten, zu einer weiteren Senkung der gemessenen Parameter. Verglichen mit dem Vektor, der die S/MAR in der ursprünglichen Orientierung enthält, wurde der Anteil exprimierender Zellen um etwa 30 %, die mittlere Expression um etwa 40 % gesenkt.

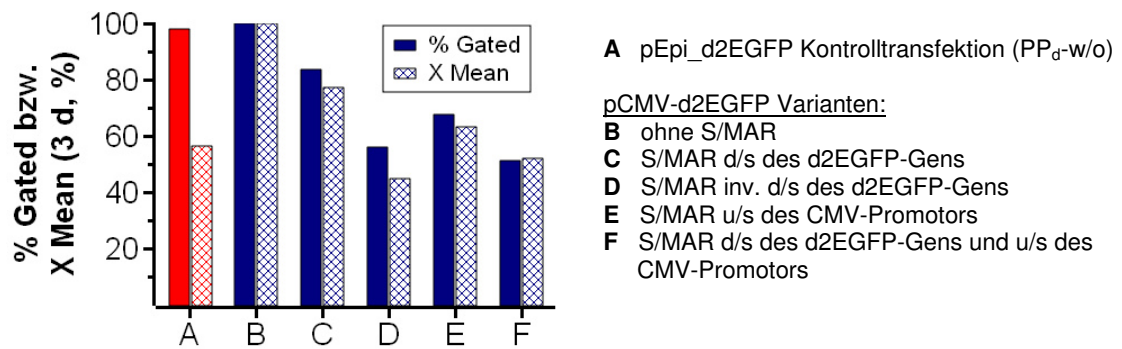


Abb. 3-20: Einfluss des CMV-S/MAR-Elements in pCMVd2EGFP-basic-Plasmiden auf die mittlere Expression und den Anteil exprimierender Zellen drei Tage nach der Transfektion.

HEK293-Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte drei Tage nach der Transfektion. Das CMV-S/MAR-Element war entsprechend Abb. 3-14, S.75 stromabwärts (d/s) des d2EGFP-Gens (Ansatz D invertiert) und / oder stromaufwärts (u/s) des CMV-Promotors einkloniert. Die Expressionshöhe bzw. der Anteil exprimierender Zellen aller Varianten wurde auf den jeweiligen Wert des Ansatzes B normiert.

Die Verwendung des CMV-S/MAR-Elements in d2EGFP Expressionsplasmiden führte nicht zu einer mit den GLuc-Experimenten vergleichbaren Expressionssteigerung. Allerdings waren die gemessenen Parameter bei beiden Reportersystemen unterschiedlich (d2EGFP: mittlere Expression aller d2EGFP-positiven Zellen, GLuc: Gesamtexpression eines transfizierten Lochs).

Die Orientierung des CMV-S/MAR-Elements stromabwärts des Reportergens war bei beiden Reportersystemen von Bedeutung. Die Invertierung der S/MAR an dieser Stelle führte bei Verwendung von d2EGFP zu einer Abnahme der mittleren Expression und des Anteils exprimierender Zellen um mindestens 30 % (Abb. 3-20).

3.6 Das *All-In-One*-Konzept

3.6.1 Limitierung der Expressionsanalysen: Minicircle-Ausbeute

In den vorangegangenen Kapiteln konnte nachgewiesen werden, dass Minicircles einem entsprechenden Parentalplasmid in der transienten Phase in Bezug auf die Expressionshöhe zweier untersuchter Reportersysteme (GLuc und d2EGFP) überlegen sein können, sofern ein S/MAR-Element enthalten ist. Dies konnte zunächst nicht zwingend erwartet werden, da S/MARs eine geordnete Chromatinstruktur benötigen, um ihre Wirkung zu entfalten (Lipps et al., 2003). Dies wiederum setzt episomale Replikation bzw. Integration voraus (Allen et al., 1996; Lipps et al., 2003).

Die Gründe und Parameter, durch die ein Minicircle in der transienten Phase Vorteile gegenüber einem entsprechenden Parentalplasmid erlangt, müssen intensiv untersucht werden. Derartige Analysen waren bisher allerdings durch die Minicircle-Ausbeute in der vorliegenden Arbeit limitiert.

3.6.2 Minicircle-Herstellung mit *E. coli* MM294 und *E. coli* EL250

Eine langjährig in der Arbeitsgruppe durchgeführte Methode zur Herstellung von Minicircles war die Verwendung des Bakterienstammes *E. coli* MM294, bei dem das Gen für die Flp-Rekombinase unter der Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors im Genom integriert ist (Buchholz et al., 1996). Die Rekombination führte jedoch vermehrt zu unerwünschten Nebenprodukten (u.a. Multimere aus MC, MP und PP), wie Hahn (2008) zeigen konnte (Abb. 3-21). Darüber hinaus war die Rekombinationseffizienz nicht zufriedenstellend und die Durchführung im größeren Maßstab aufwändig und nicht mit industriellen Routinen vereinbar.

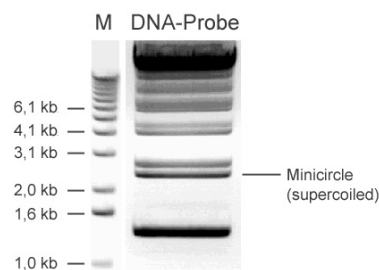


Abb. 3-21: Beispiel für den Erfolg der Rekombination eines Parentalplasmids mittels Hitzeinduktion in *E. coli* MM294 (modifiziert nach Hahn, 2008).

Eine DNA-Probe der Minicircle-Herstellung in *E. coli* MM294 mittels Hitzeinduktion wurde im Agarosegel aufgetrennt. Es sind mehr als drei Banden (Minicircle, Miniplasmid, Parentalplasmid) vorhanden, die u.a. durch Multimerisierung der einzelnen DNA-Moleküle entstehen. Abkürzungen: kb Kilobasenpaare, M DNA-Marker 1 kb.

Die Möglichkeit, Minicircles mithilfe des Bakterienstammes *E. coli* EL250 (Lee et al., 2001) herzustellen, wurde in dieser Arbeit angewendet. Bei diesem Stamm ist das Gen für die Flp-Rekombinase unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors im Genom integriert. Die Nebenprodukte, die beim hitzeinduzierbaren Ansatz ein Problem darstellten, wurden mit dem Arabinose-induzierbaren System auf ein Minimum reduziert. Darüber hinaus ist eine Maßstabsvergrößerung (*Scale-Up*) gegenüber der Hitzeinduktionsmethode vereinfacht.

Die erzielten Rekombinationseffizienzen waren jedoch sowohl für die Ansprüche transienter Transfektionen als auch systematische Analysen der transienten Phase zu gering. Der Stamm *E. coli* EL250 hat darüber hinaus anscheinend eine vergleichsweise geringe Plasmidkopienzahl, was sich ebenfalls negativ auf die Minicircle-Ausbeute auswirkt.

Aufgrund der bis hierher nicht ausreichend zur Verfügung stehenden Mengen an Minicircle-DNA war es notwendig, ein neuartiges System für die Herstellung von Minicircles zu entwickeln, das höhere Ausbeuten garantieren sollte. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit das *All-In-One*- und das *improved All-In-One*-Konzept entwickelt.

3.6.3 Der neuartige Vektortyp pAIO

Beim *All-In-One*-Konzept ist eine Kopie des Flpe-Gens (Buchholz et al., 1998) unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors (*All-In-One*-Kassette, Abb. 3-22) direkt auf dem bakteriellen Rückgrat des Plasmides kodiert, welches für die Herstellung des Minicircles verwendet werden soll. Dieses System bietet Vorteile gegenüber den beiden oben genannten Ansätzen. Zum Einen ist die Wahl des *E. coli*-Stammes weniger eingeschränkt, so dass ein Stamm verwendet werden kann, der eine höhere Plasmidkopienzahl erlaubt. Zum Anderen ist eine höhere Kopienzahl des Flpe-Gens in einer Zelle vorhanden. Daher können größere Mengen des Enzyms von der Zelle hergestellt werden, was zu einer erhöhten Rekombinationseffizienz führen sollte. Bedeutend ist darüber hinaus die Überlegung, dass aufgrund der fehlenden räumlichen Trennung von Transkription und Translation in Bakterien die Flpe-Synthese direkt am Plasmid und damit dem Substrat selbst stattfindet.

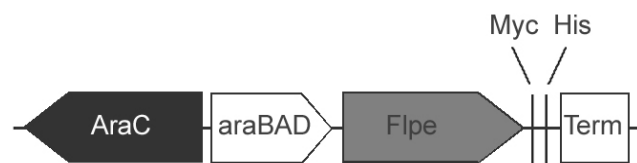
Die Erwartungen, die an das *All-In-One*-Konzept gestellt werden konnten, sind den beiden bisherigen Minicircle-Produktionsverfahren in Tab. 3-5 gegenübergestellt.

Tab. 3-5: Gegenüberstellung der grundlegenden Eigenschaften dreier Minicircle-Produktionsverfahren.

Zeichenerklärung: - - - nachteilig / negativ, +++ sehr gut / hoch, n. b. nicht bestimmt

	Hitzeinduktion (Flp gen.)	Ara-Induktion (Flp gen.)	Ara-Induktion (Flpe-Plasmid)
Bakterienstamm	<i>E. coli</i> MM294	<i>E. coli</i> EL250	relativ frei wählbar
Rekombinationseffizienz	+	+	++(+)
Nebenprodukte	- - -	-	-
Kopien / Zelle	n. b.	+	++(+)
Maßstabsvergrößerung	-	+++	+++

Für die Klonierung der *All-In-One*-Kassette (Abb. 3-22) wurde das Flpe-Gen (Vektor pBAD24_Flpe; Buchholz et al., 1998) in die MCS des Vektors pBAD Myc/His B (Fa. Invitrogen) ligiert, der sowohl die Information für den Transkriptionsregulator AraC als auch den Arabinose-induzierbaren Promotor araBAD enthält. Im Leseraster des Flpe-Gens befinden sich darüber hinaus ein Myc-tag und ein His-tag. Beide wurden beibehalten, um die Flpe-Rekombinase gegebenenfalls zwecks Optimierung des Systems nachweisen und quantifizieren zu können.

**Abb. 3-22: Schematischer Aufbau der All-In-One-Kassette.**

Das Plasmid, welches die All-In-One-Kassette enthält, basiert auf dem Vektor pBAD Myc/His B (Fa. Invitrogen), in den das Flpe-Gen einkloniert wurde. Enthalten sind zwei Gene, die für den Transkriptionsregulator AraC bzw. die Rekombinase Flpe kodieren, sowie der araBAD Promotor, zwei tags (Myc und His) und eine Terminationssequenz.

Der neue Vektortyp pAIO (Abb. 3-23), entstand durch das Einklonieren der *All-In-One*-Kassette in einen pEpi-Vektor. Zu beachten ist hierbei, dass pAIO-Plasmide in dieser Arbeit keine Parentalplasmide darstellten. Die *All-In-One*-Kassette ist eine zusätzliche, prokaryotische Expressionseinheit auf dem bakteriellen Rückgrat des entsprechenden Plasmids. Aufgrund der Größe der Kassette und nicht auszuschließender Nebeneffekte wurde beim Vergleich von Minicircles mit ihren korrespondierenden Parentalplasmiden grundsätzlich auf den pEpi-Vektortyp (ohne *All-In-One*-Kassette) zurückgegriffen. Der pAIO-Vektor diente ausschließlich der Rekombination und damit der Herstellung der Minicircles (Abb. 3-23).

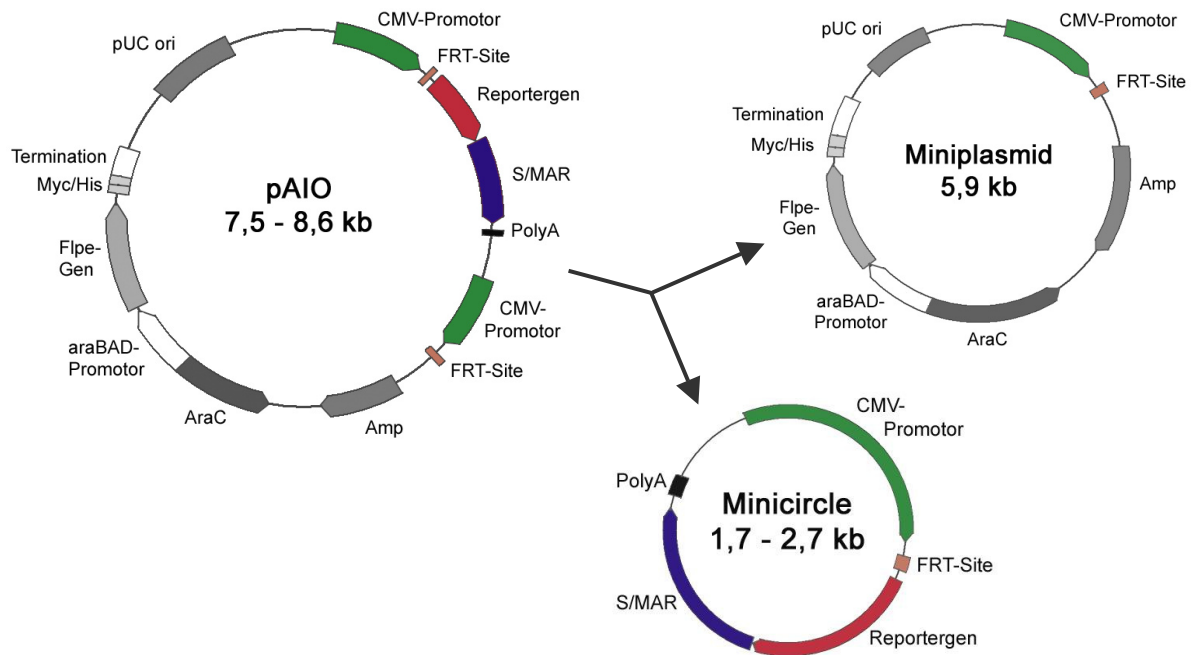


Abb. 3-23: Schematische Darstellung des pAIO-Vektortyps und Rekombination in Minicircle und Miniplasmid.

Eukaryotische Elemente sind farbig gezeichnet, prokaryotische Elemente sind entsprechend in Graustufen gehalten. Die in dieser Arbeit verwendeten pAIO-Vektoren hatten eine Größe zwischen 7,5 kb und 8,6 kb, von der das Miniplasmid 5,9 kb einnahmen. Die verwendeten Minicircles hatten entsprechend Größen zwischen 1,7 kb und 2,7 kb. Zur Herstellung der Minicircle-Kontrollen wurden S/MAR-freie Plasmide verwendet (vgl. Abb. 3-8, S. 65). Die entsprechenden pAIO-Vektoren enthielten die All-In-One-Kassette in entgegengesetzter Orientierung (Resultat der Klonierung), was sich für die Minicircle-Produktion als unerheblich herausstellte.

3.6.4 Optimierung des Protokolls für die Arabinose-Induktion

Für die Optimierung der Arabinose-Induktion wurden zwei unterschiedliche Bakterienstämme ausgewählt. *E. coli* TOP10 wurde von der Fa. Invitrogen für die Verwendung des pBAD-Systems empfohlen. *E. coli* XL1 Blue MRF' war der im Labor verwendete Standardstamm für alle durchgeführten Klonierungen und sollte daher auf seine Eignung hin untersucht werden. Die Optimierung erfolgte in zwei bzw. drei Schritten mit dem Plasmid pAIO-CMV_{MAR}_GLuc.

Erster Optimierungsschritt:

Im ersten Schritt wurde eine Konzentrationsreihe von L-Arabinose über sieben Zehnerpotenzen ($2 \cdot 10^{-6} \%$ bis 2%) durchgeführt (Tab. 3-6). Die Induktion erfolgte für 2,5 h bei den Temperaturen $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Von jedem Ansatz wurden vor und nach der Induktion Proben genommen, um anschließend die extrachromosomale DNA zu isolieren.

Tab. 3-6: Übersicht über die Ansätze der L-Arabinose-Konzentrationsreihe zur Optimierung des Protokolls für die Arabinose-Induktion.

Abkürzung: c_{L-Ara} Konzentration der L-Arabinose.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
c_{L-Ara} [%]	0,000002	0,00002	0,0002	0,002	0,02	0,2	2,0

Bei 37 °C Inkubationstemperatur konnte bei keiner der eingesetzten L-Arabinose-Konzentrationen eine erfolgreiche Induktion nachgewiesen werden. Die Induktion war bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C hingegen ab Ansatz 5 (0,02 % L-Arabinose) erfolgreich (Abb. 3-24).

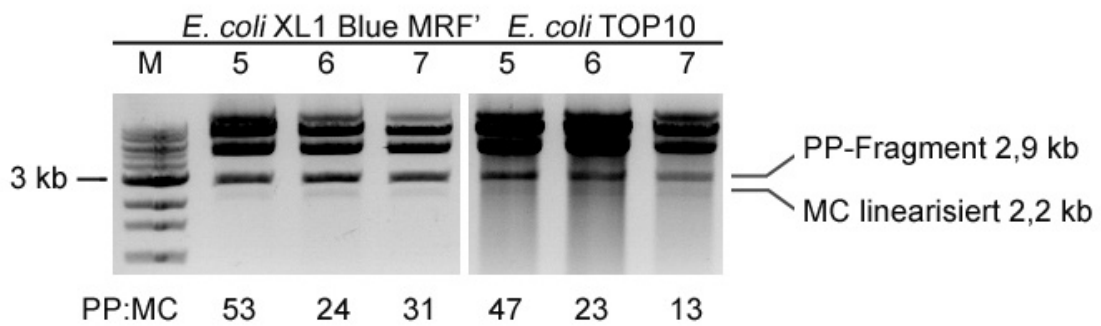


Abb. 3-24: Optimierung des Protokolls der Arabinose-Induktion für pAIO-Vektoren – L-Arabinose-Konzentrationsreihe.

Dargestellt ist ein 1 % Agarosegel der L-Arabinose-Konzentrationsreihe bei 30 °C (verstärkter Kontrast). Die DNA-Proben wurden mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut (Single-Cutter im Minicircle, Double-Cutter im Parentalplasmid). Die sichtbaren Bandengrößen sind: Parentalplasmid – zwei lineare Fragmente 5,2 kb und 2,9 kb, Miniplasmid – supercoiled 5,9 kb, Minicircle – linearisiert 2,2 kb. Das Parentalplasmid wurde aufgrund der besseren Auftrennung für die anschließende Auswertung in zwei Fragmente geschnitten. Beschriftung: M Marker (1 kb Ladder), Ansatz 5 – 0,02 % L-Ara, Ansatz 6 – 0,2 % L-Ara, Ansatz 7 – 2 % L-Ara. Unter der Abbildung sind die densitometrisch bestimmten Verhältnisse der 2,9 kb Bande des Parentalplasmids und der 2,2 kb Bande des Minicircles je Ansatz angegeben. Abkürzungen: kb Kilobasenpaare, M Marker 1 kb Ladder, MC Minicircle, PP Parentalplasmid.

Die mit dem Restriktionsenzym BglII verdauten DNA-Proben (Abb. 3-24), die aus dem Experiment erhalten wurden, wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Bandenintensitäten densitometrisch mithilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Das Parentalplasmid wurde aus Gründen der besseren Auftrennung zweifach geschnitten (lineare Fragmente: 5,2 kb und 2,9 kb). Die Intensität der 2,9 kb Bande des Parentalplasmids und der 2,2 kb Bande des Minicircles wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die optimale L-Arabinose-Konzentration für die Induktion lag zwischen 0,2 % und 2,0 %.

Die bei Verwendung von *E. coli* EL250 protokollierte Konzentration betrug 0,3 % L-Arabinose (Markus Heine, persönliche Mitteilung) und wurde aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse auch für das *All-In-One*-Konzept weiter verwendet.

Zweiter Optimierungsschritt:

Im zweiten Schritt erfolgte mit der optimierten L-Arabinose-Konzentration von 0,3 % und der Induktionstemperatur von 30 °C eine Zeitreihe über 22,5 h (Tab. 3-7).

Tab. 3-7: Übersicht über die Ansätze der Zeitreihe mit 0,3 % L-Arabinose zur Optimierung der Arabinose-Induktion.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zeit [h]	0,5	1	1,5	2	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6,5	22,5

Aus den während der Zeitreihe entnommenen Proben wurde die extrachromosomale DNA isoliert. Anschließend wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym BsrGI (Fa. NEB), welches das Parentalplasmid und den Minicircle linearisiert, verdaut und in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Durch die Linearisierung wurden die DNA-Banden stärker mit Ethidiumbromid angefärbt und die Auswertung vereinfacht. Auch hier erfolgte die densitometrische Bestimmung des Intensitätsverhältnisses der Banden des Parentalplasmids und des Minicircles mithilfe des Programms ImageJ (Abb. 3-25).

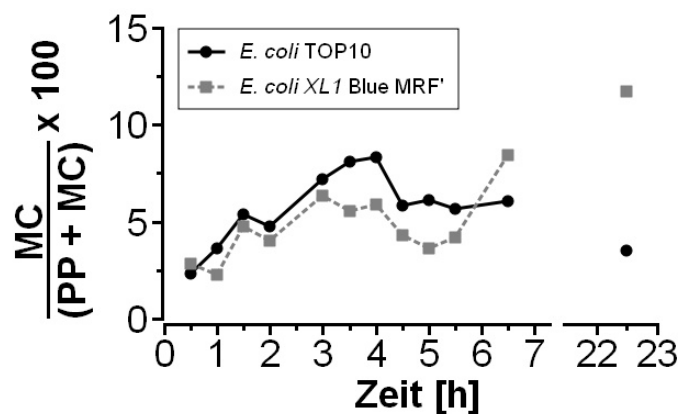


Abb. 3-25: Zeitreihe der L-Arabinose-Induktion für die beiden Stämme *E. coli* XL1 Blue MRF' und *E. coli* TOP10 über 22,5 h.

Aus den während der Zeitreihe entnommenen Proben wurde die extrachromosomale DNA isoliert. MC und PP wurden mittels Restriktionsverdau (BsrGI) linearisiert und in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Intensität der Banden von MC und PP wurde densitometrisch mithilfe des Programms ImageJ bestimmt. Dargestellt ist der Anteil MC an der Summe aus PP und MC in Abhängigkeit von der Zeit nach der Induktion.

Der Anteil des Minicircles an der Gesamtmenge aus Parentalplasmid und Minicircle ist ein Indikator für die Rekombinationseffizienz. Je mehr Minicircle im Verhältnis zum Parentalplasmid vorhanden ist, desto höher ist der Wert des Quotienten und desto höher ist die Rekombinationseffizienz.

Für die beiden verwendeten Stämme war der Verlauf des Quotienten über die Dauer von 22,5 h unterschiedlich. Bei *E. coli* XL1 Blue MRF' war die Effizienz nach 22,5 h am höchsten. Eine Induktionsdauer von 6,5 h erwies sich ebenfalls als geeignet. Bei *E. coli* TOP10 hingegen lag das Maximum bei 4 h Induktion. Im Verlauf einer längeren Inkubation nahm die Menge des Parentalplasids im Vergleich zum Minicircle wieder zu. Eine Induktion über Nacht war daher ungeeignet.

Dritter Optimierungsschritt:

Der dritte Schritt der Optimierung des Induktionsprotokolls wurde nur mit dem Stamm *E. coli* XL1 Blue MRF' durchgeführt, da dieser vielversprechende Ergebnisse für eine Langzeitinduktion lieferte.

In diesem Schritt wurde der ersten üN-Induktion eine zweite üN-Induktion angeschlossen. Das Verfahren basiert auf der Überlegung, dass auch während der Induktion das Parentalplasmid weiter synthetisiert wird, sodass das Substrat der Reaktion fortlaufend nachgeliefert wird. Durch einen zweiten Induktionsschritt würde auch dieses Substrat umgesetzt, so dass sich die Minicircle-Ausbeute steigern lassen sollte.

In einer beispielhaft durchgeführten L-Arabinose-Induktion in *E. coli* XL1 Blue MRF' (50 mL-Maßstab) konnte die Rekombinationseffizienz von 14 % (eine Induktion) auf 28 % (zwei Induktionen) gesteigert werden. Die Rekombinationseffizienz wurde folglich durch einen zweiten Induktionsschritt verdoppelt.

Limitierend für dieses Verfahrens könnte die Verdünnung des Minicircles durch Teilung der Bakterien sein (weitere 24 h Inkubation), da der Minicircle von der Zelle nicht nachproduziert werden kann und ihr auch keine Vorteile verschafft.

Um diese Einschränkung zu überprüfen, wurde die relative, gesamte extrachromosomale DNA-Ausbeute (PP + MC + MP + Nebenprodukte) anhand von Proben, die vor der Induktion und nach der ersten und zweiten Induktion genommen wurden, ermittelt (Abb. 3-26). Demnach ergab sich ein durchschnittlicher extrachromosomaler DNA-Verlust von mehr als 50 % im Verlauf der ersten Induktion. Während der zweiten Induktion wurde allerdings kaum weiterer Verlust nachgewiesen.

Für das Minicircle-Herstellungsverfahren bedeutete dies, dass durch eine zweite Induktion keine Minicircle-Verluste durch Verdünnung des Minicircles zu erwarten waren. Gleichzeitig ermöglichte die zweite Induktion eine enorme Steigerung der Rekombinationseffizienz (Verdoppelung im durchgeführten Beispiel).

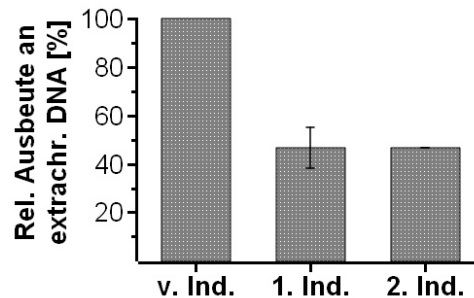


Abb. 3-26: Gesamter Verlust an extrachromosomaler DNA in einer 2 mL Kulturvolumen umfassenden Probe während der ersten und zweiten Arabinose-Induktion in *E. coli* XL1 Blue MRF'.

Die gesamte Ausbeute der extrachromosomalen DNA in den vor der Induktion entnommenen Proben wurde jeweils als 100 % gesetzt. Abkürzungen: extrachr. extrachromosomale DNA, Ind Induktion, Rel. relative.

3.6.5 Anwendung des *All-In-One*-Konzepts

Das *All-In-One*-Konzept wurde für die Herstellung von Minicircles mithilfe der pAIO-Vektortypen verwendet. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse mit denen der Minicircle-Produktion in *E. coli* EL250 verglichen.

Exemplarisch sind in Abb. 3-27 zwei Agarosegele dargestellt. Sie zeigen DNA-Proben, die nach der zweifachen Induktion in (a) *E. coli* XL1 Blue MRF' und nach der Standardinduktion in (b) *E. coli* EL250 genommen und im Minicircle und Parentalplasmid mit dem Restriktionsenzym BsrGI (Fa. NEB) linearisiert wurden. Die Rekombinationseffizienzen lagen in den dargestellten Beispielen bei (a) 67 % und (b) 7 %.

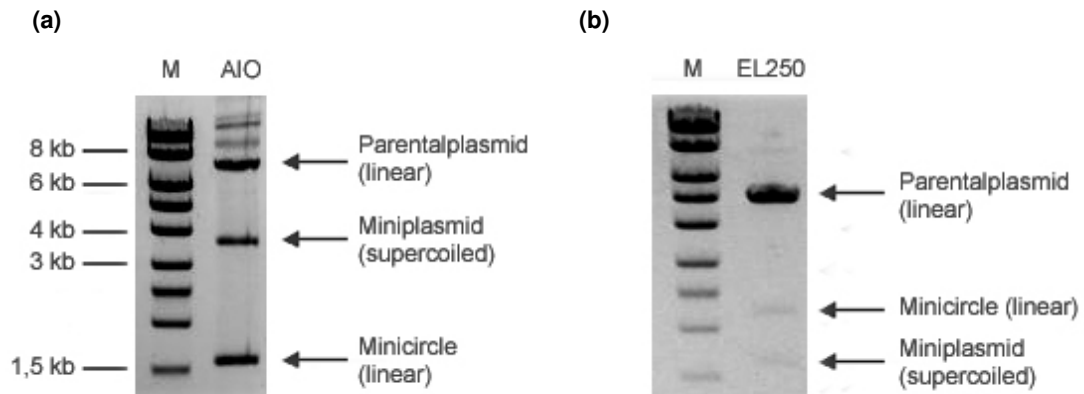


Abb. 3-27: Vergleich der Minicircle-Produktion in *E. coli* XL1 Blue MRF' und *E. coli* EL250.

1 % Agarosegele mit Proben nach der Induktion der Minicircle-Produktion in *E. coli* XL1 Blue MRF' und *E. coli* EL250. Minicircle und Parentalplasmid wurden mit dem Restriktionsenzym *BsrGI* linearisiert. **(a)** *E. coli* XL1 Blue MRF', Plasmid pAIOre_GLuc, aufgetragen sind 150 ng Gesamt-DNA; **(b)** *E. coli* EL250, Plasmid pEpi-CMVMar_GLuc, aufgetragen sind 130 ng Gesamt-DNA. Abkürzungen: AIO All-In-One, EL250 Stamm *E. coli* EL250, kb Kilobasenpaare, M MassRuler Ladder.

Die Mittelwerte der Rekombinationseffizienzen in Minicircle-Produktionen mit den drei Stämmen *E. coli* EL250, *E. coli* XL1 Blue MRF' und *E. coli* TOP10 sind in Abb. 3-28 grafisch dargestellt.

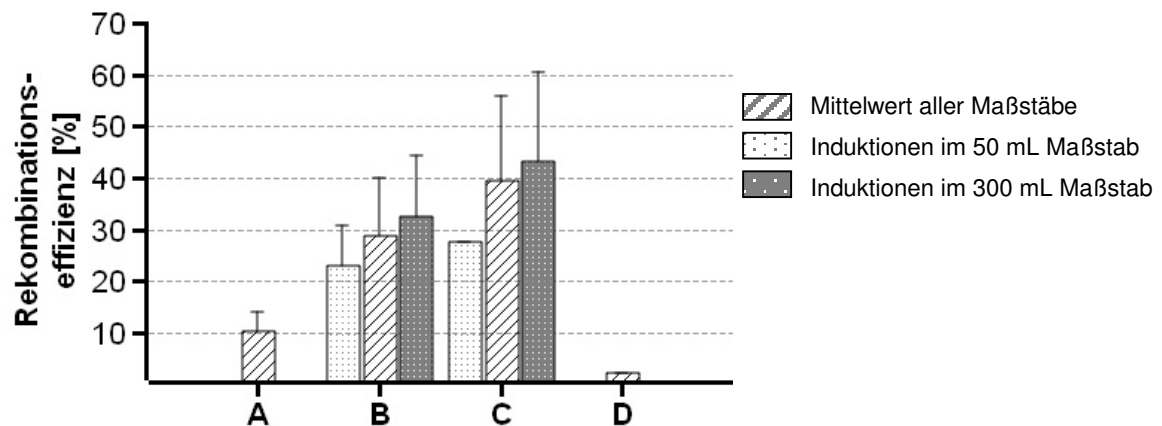


Abb. 3-28: Rekombinationseffizienz mit unterschiedlichen Bakterienstämmen.

Dargestellt sind Mittelwerte der Rekombinationseffizienz nach L-Arabinose-Induktion mit Fehlerindikatoren (mindestens drei unabhängige Experimente, außer C 50 mL und D).

A *E. coli* EL250, eine Induktion

B *E. coli* XL1 Blue MRF', eine Induktion

C *E. coli* XL1 Blue MRF', zwei Induktionen

D *E. coli* TOP10, eine Induktion

In *E. coli* EL250 wurde demnach durchschnittlich eine Rekombinationseffizienz von 10 % erreicht.

Bei Verwendung des Stammes *E. coli* XL1 Blue MRF' wurden zwei unterschiedliche Produktionsmaßstäbe verwendet (50 mL und 300 mL). Sowohl das Wachstum der üN-Kulturen vor der Induktion ($OD_{600} \sim 2,0$) als auch das Wachstum während der beiden Induktionen (Faktor 1,3 – 1,6) war maßstabsunabhängig. Die im 50 mL-Maßstab gemessene Rekombinationseffizienz war hingegen 10 – 15 % geringer als diejenige im 300 mL-Maßstab. Darüber hinaus führte die bei *E. coli* XL1 Blue MRF' standardmäßig angewandte zweite Induktion noch einmal zu einer durchschnittlichen Steigerung der Rekombinationseffizienz um 10 %. Damit war die mittlere Rekombinationseffizienz nach zwei Induktionen in *E. coli* XL1 Blue MRF' etwa viermal höher als die in *E. coli* EL250 erzielte.

E. coli TOP10 spielte für die Minicircle-Produktion keine Rolle, da die Effizienz in einem beispielhaft durchgeführten Experiment geringer als in *E. coli* EL250 war.

Exemplarisch wurde die gesamte extrachromosomale DNA-Ausbeute aus *E. coli* XL1 Blue MRF' gegenüber *E. coli* EL250 nach jeweils einer Induktion als drei- bis viermal höher bestimmt. Damit war die Verwendung des *All-In-One*-Konzepts nicht nur unter dem Gesichtspunkt der Rekombinationseffizienz, sondern auch in Bezug auf die relativ freie Wahl eines Bakterienstammes, der eine höhere Plasmidkopienzahl erlaubte, die Methode der Wahl.

Tab. 3-8 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Minicircle-Produktionsmöglichkeiten.

Tab. 3-8: Parameter der Minicircle-Herstellung in *E. coli* EL250 und *E. coli* XL1 Blue MRF'.

Gegenüberstellung der Parameter der Minicircle-Herstellung in *E. coli* EL250 mit dem genomisch kodierten Flp-Enzym und in *E. coli* XL1 Blue MRF' mit dem plasmidkodierten Enzym Flpe.

	Flp genomisch kodiert	Flpe plasmidkodiert
Stamm	<i>E. coli</i> EL250	<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'
getesteter Maßstab	2 mL, 50 mL, 100 mL	2 mL, 50 mL, 300 mL
Medium für Induktion	M9 MM + 0,3 % L-Arabinose	M9 MM + 0,3 % L-Arabinose
Induktionsdauer	2,5 h	2x ü.N.
Rekombinationseffizienz	7 % - 17 %	25 % - 67 % (zwei Induktionen)
Relative Plasmidausbeute	1	3 – 4
Relative Minicircle-Ausbeute	1	≥ 10

Mithilfe des *All-In-One*-Konzepts ließ sich die Minicircle-Ausbeute um mindestens eine Zehnerpotenz steigern.

3.7 Das *improved All-In-One*-Konzept

3.7.1 Das Prinzip des *improved All-In-One*-Konzepts

Das *improved All-In-One*-Konzept stellt eine Erweiterung des *All-In-One*-Konzepts zur Optimierung der Aufreinigung eines Minicircles dar. Bisher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die gesamte extrachromosomale DNA nach der Induktion aus dem verwendeten Bakterienstamm isoliert und der Minicircle anschließend aus einem Agarosegel aufgereinigt. Insgesamt waren folglich zwei Aufreinigungsschritte nötig, die jeweils mit Verlusten des Minicircles einhergingen.

Das *improved All-In-One*-Konzept wurde in Anlehnung an die Publikationen von Chen et al., (2005) und Yoon et al. (2009) geplant. Das bakterielle Plasmidrückgrat enthält hier nicht nur eine Arabinose-induzierbare Expressionseinheit für die verwendete Flpe-Rekombinase, sondern auch eine entsprechende Einheit für die Homing Endonuklease I-SceI sowie die Erkennungssequenz dieses Enzyms (I-SceI- bzw. *improved All-In-One*-Kassette, Abb. 3-29). Somit kann I-SceI sowohl das gesamte Plasmid als auch das Miniplasmid nach der Rekombination *in vivo* linearisieren. Infolgedessen werden beide Plasmide von zelleigenen DNA-Exonukleasen erkannt und abgebaut. Als niedermolekulare DNA-Fraktion bleibt lediglich der Minicircle übrig, der anschließend in einem einzigen Aufreinigungsschritt (Isolierung extrachromosomaler DNA) gewonnen werden kann (Abb. 3-30).

Auf die Einschränkungen des gewählten *Set-Ups* wird in Kapitel 3.7.2 eingegangen.

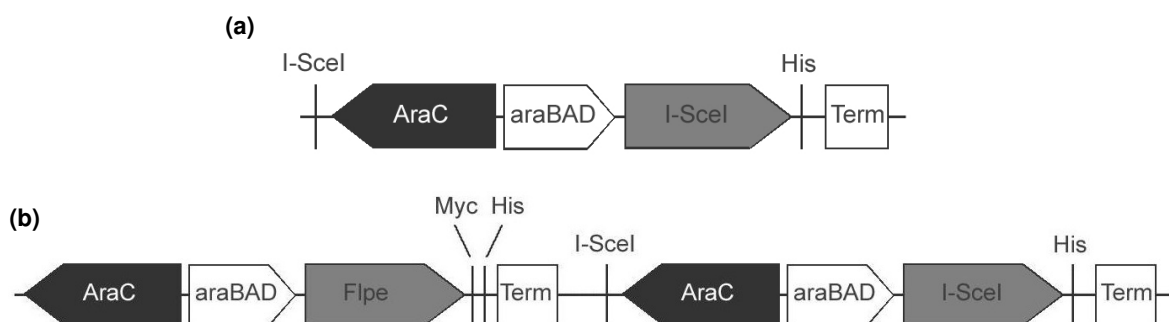


Abb. 3-29: Schematische Darstellung der (a) I-SceI-Kassette und der (b) *improved All-In-One*-Kassette.

In dem Plasmid, das für die I-SceI-Kassette kodiert, wurde das Flpe-Gen gegen das I-SceI-Gen ausgetauscht und eine I-SceI-Erkennungssequenz (gemäß Fa. NEB) einkloniert. Beim Austausch der beiden Gene wurde darüber hinaus der Myc-tag ausgeschnitten. Die *All-In-One*- und die I-SceI-Kassette wurden hintereinander kloniert und bildeten dann als Gesamteinheit die *improved All-In-One*-Kassette. Dabei war die Reihenfolge beider Kassetten unerheblich (hier dargestellt: *All-In-One* – I-SceI-Kassette).

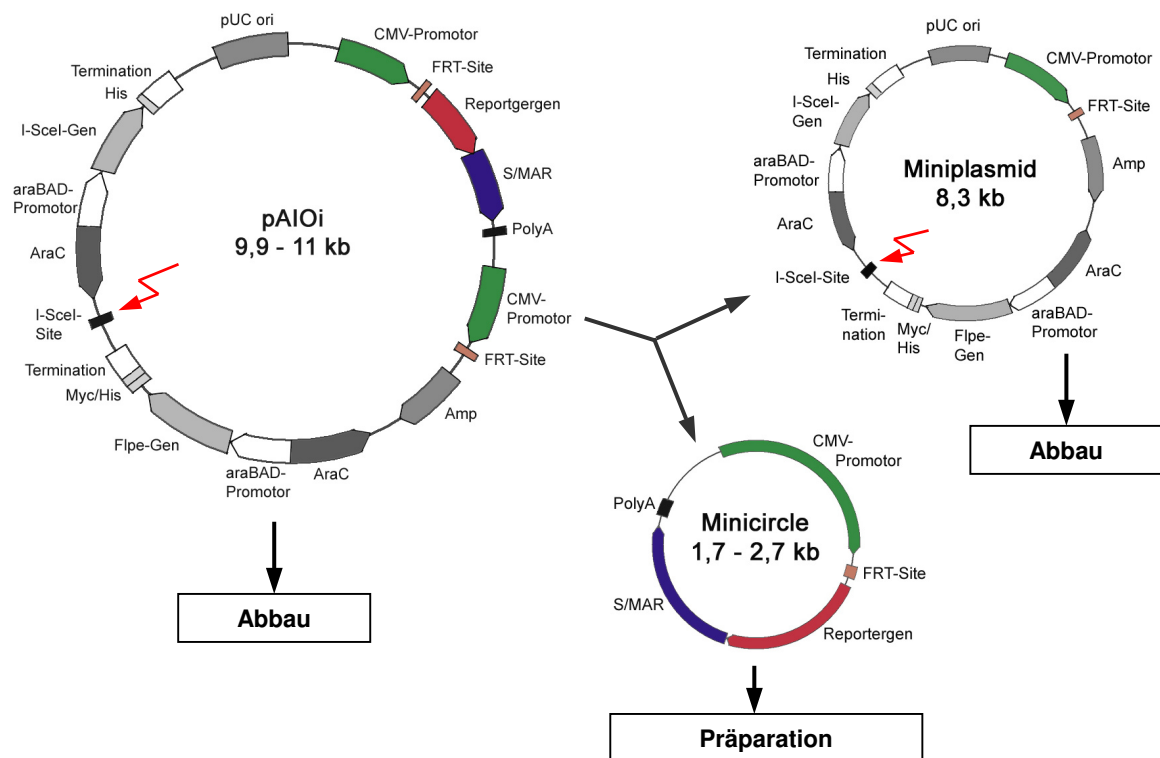


Abb. 3-30: Schematische Darstellung der Wirkung der I-SceI-Kassette im pAIOi-Vektortyp nach der Rekombination in Miniplasmid und Minicircle mittels Flpe-Rekombinase.

Mit roten Pfeilen sind die Schnittstellen markiert, die *in vivo* zu einer Linearisierung des pAIOi-Vektors und des Miniplasmids mittels I-SceI führen. Infolgedessen werden die beiden linearen DNA-Fragmente von zelleigenen DNA-Exonukleasen abgebaut. Der Minicircle hingegen wird nicht geschnitten, bleibt somit supercoiled und kann anschließend in einer herkömmlichen Präparation extrachromosomaler DNA aufgereinigt werden.

3.7.2 Nachweis der Funktionalität der *improved All-In-One*-Kassette

Das Plasmid pAIOi-CMV_{MAR}_GLuc wurde aus dem Plasmid pAIO-CMV_{MAR}_GLuc durch Hinzufügen der I-SceI-Kassette kloniert. Zunächst wurden also zwei Arabinose-induzierbare Expressionseinheiten, die sich nur durch das Zielgen unterschieden, hintereinandergeschaltet, da das Klonierungsprotokoll für eine einzelne Kassette etabliert war und somit eine schnelle Klonierung gewährleistet werden konnte.

Die gewählte Ordnung der *improved All-In-One*-Kassette ist allerdings nicht optimal. Zum Einen wird erwartet, dass die Sequenz für das AraC-Gen lediglich einmal benötigt wird. Zum Anderen erscheint es sinnvoll, I-SceI erst nach Beendigung der Rekombination durch Flpe anzuschalten, da I-SceI sonst das Substrat abbauen könnte, ehe die Rekombination stattgefunden hat.

Bei Yoon et. al (2009) beinhaltet das Minicircle-Produktionsprotokoll sowohl eine pH- als auch einen Temperaturverschiebung, um I-SceI erst an einem gewünschten Zeitpunkt zu aktivieren. In Anlehnung daran wurde auch hier ein Temperatursprung (30 °C → 37 °C)

getestet. Auf die Anwendung einer pH-Veränderung des Kulturmediums wurde vorerst verzichtet, da die Auswirkung auf den intrazellulären pH-Wert zweifelhaft erschien.

Nach der Klonierung wurden zwei Klone des Vektors pAIOi-CMV_{MAR}_GLuc mit jeweils einer unterschiedlichen Mutation identifiziert (Klonnummern 78 und 114) und verwendet. Der Klon 78 enthält eine Punktmutation im AraC-Gen, die zu einem Austausch von Histidin gegen Arginin führt (Kodon CAC → CGC). In Klon 114 ist im I-SceI-Gen eine Punktmutation enthalten, durch die die Aminosäure Leucin gegen Prolin ausgetauscht wird (Kodon CTG → CCG).

Mit beiden Klonen wurde eine L-Arabinose-Induktion durchgeführt, um die Funktionalität der I-SceI-Kassette zu testen (Abb. 3-31). Das Experiment enthielt einen Temperatursprung gemäß Yoon et al. (2009).

Die Induktion der Rekombination des Parentalplasmids in Minicircle und Miniplasmid war erfolgreich. Die Effizienz, die hier nicht quantifiziert wurde, war allerdings sichtbar unterschiedlich (Effizienz bei Klon 114 geringer). In den Proben des Klons 78 waren zusätzliche DNA-Banden vorhanden, die bei der Verwendung des entsprechenden pAIO-Klons (pAIO-CMV_{MAR}_GLuc) nicht aufgetreten waren. Durch Zugabe von D-Glukose zum Medium der üN-Kultur konnten diese minimiert werden.

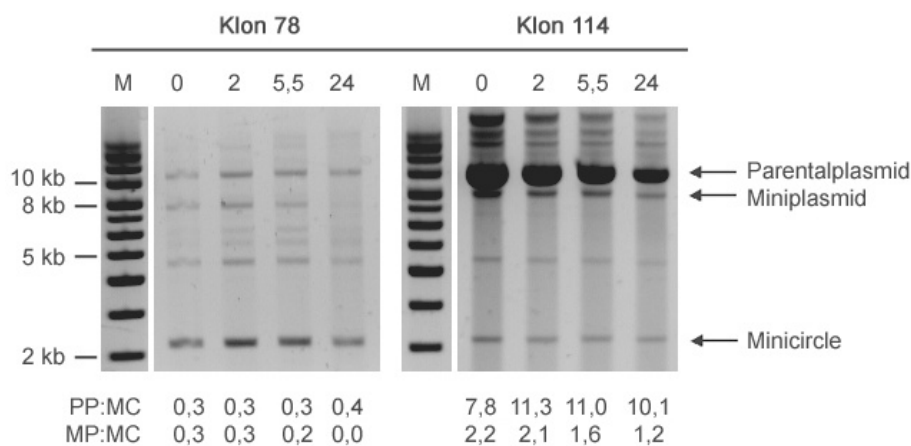


Abb. 3-31: Test der Funktionalität der improved All-In-One-Kassette.

Dargestellt ist ein 1 % Agarosegel der Proben der L-Arabinose-Induktion der beiden Klone 78 und 114 im 50 mL-Maßstab. Die Proben wurden unverdaut aufgetragen. Unter der Abbildung sind die densitometrisch bestimmten Verhältnisse der Banden des Parentalplasmids und des Minicircles sowie des Miniplasmids und des Minicircles angegeben. Die Probennummern sind Zeitangaben der Inkubation, die bei 37 °C erfolgte, in Stunden. Bevor die Inkubation bei 37 °C erfolgte, wurden die Zellen bei 30 °C für 22,5 h inkubiert (gemäß Standardprotokoll). Abkürzungen: kb Kilobasenpaare, M Supercoiled-Ladder, MC Minicircle, MP Miniplasmid, PP Parentalplasmid.

Die Quotienten der Bandenintensität des Parentalplasmids und Minicircles bzw. des Miniplasmids und Minicircles geben Auskunft über einen möglichen Abbau des Parentalplasmids und des Miniplasmids (aufgeführt in Abb. 3-31). Die Menge des Minicircles, die in den *E. coli*-Zellen nach der üN-Induktion vorhanden war, wurde hierbei als konstant bzw. tendenziell sinkend angenommen.

Erwartungsgemäß sollte der Wert des Quotienten bei einer funktionalen I-SceI-Kassette abnehmen. Dies traf für das MP:MC-Verhältnis zu. Bei Klon 78 war am Ende der Inkubation kein Miniplasmid mehr in der Probe nachweisbar. Das PP:MC-Verhältnis hingegen stieg im Verlauf des Experimentes leicht an. Die Menge des Parentalplasmids nahm folglich im Verhältnis zur Menge des Minicircles zu.

Die Funktionalität der I-SceI-Kassette wurde durch den Abbau des Miniplasmids nachgewiesen. Für einen vollständigen Abbau sowohl des Miniplasmids als auch des Parentalplasmids bedarf es weiterer Optimierungsschritte auf DNA-Ebene (Optimierung der *improved All-In-One*-Kassette) und bei der praktischen Durchführung der Induktion.

4. Diskussion

Pharmaproteine werden vorwiegend unter Verwendung von Säuger-Expressionssystemen hergestellt, um eine korrekte Faltung und posttranslationale Modifikationen zu gewährleisten (Wurm, 2004; Jenkins et al., 2008). In der Industrie stellen heutzutage nicht-virale Vektoren zur stabilen Transgenexpression die Methode der Wahl dar (Wurm, 2004). Für einen schnellen Zugang zu größeren Mengen oder die Untersuchung unterschiedlicher Varianten eines Proteins kann hingegen die transiente Genexpression eingesetzt werden. Allerdings ist deren umfangreicher Einsatz durch eine gewöhnlich relativ kurze Expressionsdauer (wenige Tage) auf niedrigem Niveau bisher erheblich eingeschränkt (Baldi et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger, nicht-viraler Ansatz für die Erhöhung der transienten Genexpression (TGE) bzw. die Verlängerung der sog. „transienten Phase“ verfolgt. Er beinhaltete die Verwendung von pEpi-basierten Parentalplasmiden und Minicircles. Die Expressionsanalyse erfolgte sowohl mit einem Transkriptionsmarker (*destabilized* EGFP), als auch mit einem sekretierten, langzeitstabilen Protein (Gaussia Luciferase). Zusätzlich wurde ein neuartiges, potentiell S/MAR-Element, das sog. CMV-S/MAR-Element, charakterisiert und mit der bereits beschriebenen, minimalen hNF- β M18-S/MAR (kurz M18-S/MAR; Broll et al., 2010) auf bioinformatischer Ebene und in transienten Transfektionsexperimenten verglichen. Der Einfluss des CMV-S/MAR-Elements auf die transiente Genexpression in nicht-pEpi-basierten, kommerziell erhältlichen Expressionsplasmiden wurde darüber hinaus mithilfe des Reporters GLuc verdeutlicht.

Ein signifikanter Nachteil der Verwendung von Minicircles ist die geringe Ausbeute bei ihrer Herstellung. Daher wurde in dieser Arbeit ein System entwickelt, um im Labormaßstab effizient ausreichende Mengen an Minicircle-DNA mit konstanter Qualität herzustellen.

4.1 Bioinformatische Analyse des CMV- und des M18-S/MAR-Elements

4.1.1 Die S/MAR-Identität des potentiellen CMV-S/MAR-Elements ist bioinformatisch bestätigt

Im stromaufwärts gelegenen Bereich der Enhancer-Region des IE1-Gens vom humanen Zytomegalievirus wurde ein knapp 600 bp langes Fragment identifiziert, welches im SIDD-Profil ein erhöhtes Potential zur Strangtrennung aufwies (Wirth, M., *unpublished*). Dieses erhielt vorerst die Bezeichnung ‚potentielles CMV-S/MAR-Element‘.

Wie Goetze (2003) zeigen konnte, führt auf bioinformatischer Ebene die Kombination eines Struktur-Vorhersageprogramms (SIDD) und eines Sequenz-Motiv-orientierten Programms (MAR-Wiz) zu einer gesicherten Aussage, ob eine S/MAR vorliegt oder nicht. Für die CMV-

S/MAR-Sequenz wurde im SIDD-Profil ein erhöhtes Destabilisierungspotential nachgewiesen (Abb. 3-1 a, b) und die MAR-Wahrscheinlichkeit beträgt hundert Prozent (Abb. 3-1 c), so dass das Vorliegen eines S/MAR-Elements als bioinformatisch bestätigt gilt.

Das neuartige CMV-S/MAR-Element hat eine besondere Eigenschaft, die im Wahrscheinlichkeitsprofil $p(x)$ deutlich wird (Abb. 3-2). In einer abgeschirmten Region (z.B. Domäne oder Plasmid) wird die Strangtrennung am wahrscheinlichsten am *core unwinding element* (CUE) auftreten, was durch einen einzelnen Peak im $p(x)$ -Diagramm dargestellt wird (Benham et al., 1997). Der Anfangsbereich der HCMV-IE1-Region hingegen enthält drei *unpairing elements* (UEs), die jeweils mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit als CUE wirken können und mit den NF1-Bindestellen II, III und IV kolokalisiert sind (Abb. 3-2). Im Bereich der NF1-Bindestelle V ist darüber hinaus noch ein vierter, schwächerer Peak vorhanden. Gemäß der von Hyde-DeRuyscher et al. (1995) beschriebenen Konsensus-Sequenz für eine Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 wurden zudem sechs Motive innerhalb der S/MAR ausgemacht, von denen zwei mit der NF1-Bindestelle II überlappen (Daten nicht gezeigt).

Zwei unterschiedliche Transkriptionsfaktoren könnten sich durch überlappende Bindemotive sterisch behindern, was eine differenzierte Regulation der Bindung in der CMV-S/MAR-Sequenz notwendig machen würde. Es ist bekannt, dass die NF1-Bindung nur in nukleosomenfreien Regionen hochaffin ist (Blomquist et al., 1996) und die Affinität durch Positionierung von *A-tracts* um eine nukleosomale NF1-Bindestelle moduliert werden kann (Blomquist et al., 1999). YY1 erkennt indes neben dem Bindemotiv auch die lokale DNA-Struktur (Shi et al., 1997; Klar et al., 2005) und bindet bevorzugt an Flanken von UEs (Klar et al., 2005). In nicht-permissiven T2-Zellen wurde zudem ein Zusammenhang zwischen der Repression der HCMV-IE-Gene und YY1 nachgewiesen (Liu et al., 1994). Die Vergabe der Bindung an einen der beiden Transkriptionsfaktoren müsste gemäß deren Eigenschaften daher wohl über eine dynamische, strukturverändernde Größe reguliert werden. Durch die Nähe der CMV-S/MAR zu einer Transkriptionseinheit und das Vorhandensein einer potentiellen Topoisomerase II-*site* in der NF1-Bindestelle II (Übereinstimmung 88 % mit dem Sequenzmotiv von Sander und Hsieh, 1985; Daten nicht gezeigt) liegt Superhelizität als regulierender Parameter nahe (Villeponteau et al., 1984; Bode et al., 2006), der zu einer sehr spezifischen Expression des IE1-Gens unmittelbar nach der Infektion von Säugerzellen mit HCMV führen könnte. Damit wäre das CMV-S/MAR-Element für die frühe Infektionsphase von großer Bedeutung.

4.1.2 Die beiden verwendeten S/MAR-Elemente unterscheiden sich in ihrem Destabilisierungsverhalten

Ein wichtiges Charakteristikum von S/MAR-Elementen ist ihr Potential zur Strangtrennung, welches sich mittels SIDD-Profil bestimmen lässt (Benham et al., 1997). Dadurch haben sie eine große Bedeutung für die Regulation der Transkription und der Replikation in Eukaryoten (Bode et al., 2001). Darüber hinaus können S/MARs in eukaryotischen Expressionsvektoren die Transkriptionsinitiationsrate erhöhen (Klehr et al., 1991; Schübeler et al., 1996).

Die in dieser Arbeit untersuchten S/MAR-Elemente (CMV und M18) haben eine ähnliche Länge und zählen zu den fakultativen S/MARs (Kriterien gemäß Bode et al., 2003). Im SIDD-Profil zeigen sich bei beiden S/MARs jeweils drei starke Minima, wobei die gesamte Destabilisierung der M18-S/MAR vergleichsweise höher ist, und ihr MAR-Potential beträgt jeweils hundert Prozent (Abb. 3-1).

Innerhalb eines isolierten DNA-Abschnitts (z.B. Plasmid) kompetieren einzelne BURs (Broll et al., 2010). Die PolyA-Stelle und der Promotor des Ampicillin-Resistenzgens neigen zur Destabilisierung und können daher als interne Standards für die Beurteilung der Kompetition herangezogen werden (Broll et al., 2010, Benham et al., 1997). Das CMV-S/MAR-Element beeinträchtigt das relative Strangtrennungspotential der Referenzelemente im Vergleich zu der Kontrolle ohne S/MAR nicht bzw. nur geringfügig (Abb. 3-3 d – g). Demnach reicht die Destabilisierung der CMV-S/MAR nicht aus, um mit dem Strangtrennungspotential der internen Standards zu kompetieren. Das hohe Strangtrennungspotential des M18-S/MAR-Elements hingegen verringert relativ das der beiden internen Standards durch Kompetition (Abb. 3-3 e, i). Daraus kann abgeleitet werden, dass wahrscheinlich auch die Bindungsstärke des M18-S/MAR-Elements an die Matrix höher ist als die des CMV-S/MAR-Elements (Bode et al., 1992), was auf unterschiedliche Funktionen beider S/MARs hindeuten könnte. Eine theoretische Erklärung dafür liefert der ursprüngliche Isolierungsort. Das CMV-S/MAR-Element entstammt der Region der *immediate early* Gene des HCMV (Hennighausen und Fleckenstein, 1986; Wirth, M., *unpublished*), wodurch aufgrund der frühen Expression nach der Infektion (Kamata et al., 1978) vermutlich eine gewisse Flexibilität im Suchen und Finden geeigneter Chromatinregionen erforderlich ist. Darüber hinaus scheint die CMV-S/MAR ein hoch-regulatives Element für die frühe Infektionsphase zu sein (s. Abschnitt 4.1.1). Im Gegensatz dazu deutet die Architektur des M18-S/MAR-Elements (hohes Strangtrennungspotential, repetitive UEs) auf eine starke Anheftung an die nukleäre Matrix hin (Mielke et al., 1990). Diese Eigenschaft könnte auf den Ursprung des SAR E-Elements zurückzuführen sein (Mielke et al., 1990; Bode et al., 1992), da sie dessen Funktion als Grenze (*bordering element*) zwischen benachbarten Domänen fördert und dadurch eine Heterochromatisierung der IFN- β Domäne verhindern kann (Stief et al., 1989). Der Herkunft entsprechend hätte die M18-S/MAR damit Eigenschaften einer konstitutiven S/MAR, doch ist

diese Funktion durch ihre geringe Länge eingeschränkt (Bode et al., 2003). Dennoch mag die Konkurrenz der M18-S/MAR mit anderen destabilisierten Elementen (wie der Polyadenylierungsstelle) interferieren. Letztendlich muss daher experimentell ermittelt werden, welches S/MAR-Element für eine gegebene Aufgabe am besten geeignet ist.

Zwischen Minicircles und korrespondierenden Parentalplasmiden wurden im SIDD-Profil des Weiteren ebenfalls Unterschiede nachgewiesen. Das Strangtrennungspotential der PolyA-Stelle, der Anfangsregion des CMV-Promotors und, sofern vorhanden, der S/MAR ist in den jeweiligen Minicircles gegenüber den Parentalplasmiden erhöht (Abb. 3-3). Da in einer superhelikalen Stress unterworfenen Domäne alle UEs konkurrieren (Bi und Benham, 2003; Broll et al., 2010), ist die Herabsetzung der Strangtrennungspotentiale einzelner UEs schlüssig. In den CMV-S/MAR-enthaltenden Vektoren führt die Konkurrenz jedoch zur Verschiebung des CUE von der S/MAR- (MC) in die pUC-Region (PP; Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich dieser Eigenschaft unterscheiden sich das CMV- und das M18-S/MAR-Element offenkundig. Das Destabilisierungsverhalten kann Auswirkungen auf die Wirkweise des CMV-S/MAR-Elements im Parentalplasmid haben. Da das hohe Strangtrennungspotential jedoch vor allem bei der episomalen Etablierung eines Vektors von Bedeutung ist (Broll et al., 2010), würde dieser Effekt vermutlich erst anhand von Etablierungsraten und der stabilen Expression sichtbar werden.

4.2 Mit Lipofectamine-2000 lassen sich auch geringe DNA-Mengen effizient transfizieren

Die Transfektionsmethode ist bei der transienten Genexpression von großer Bedeutung (Baldi et al., 2007). Für die Transfektion der adhärenz wachsenden HEK293-Zellen wurde in dieser Arbeit Lipofectamine-2000 (Invitrogen) verwendet, da die Lipofektion eine hohe Transfektionseffizienz garantiert, ohne mit dem superhelikalen Status der DNA zu interferieren. Sie ist daher insbesondere für Minicircles geeignet (Broll et al., 2010). Aufgrund der relativ geringen Ausbeuten bei der Minicircle-Herstellung mittels Arabinose-Induktion in *E. coli* EL250 (Nanogramm-Bereich) wurde das Transfektionsprotokoll zunächst für geringe, transfizierte DNA-Mengen optimiert (mit PP_d-CMV gemäß Abb. 3-8). Dabei wies der d2EGFP-exprimierende Anteil der transfizierten HEK293-Zellen eine deutliche Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge auf (Abb. 3-5 a; 25 % → 5 %), wohingegen die mittlere Expression im Bereich von einer Zehnerpotenz transfizierter DNA-Mengen (14 fmol bis 168 fmol) weitgehend konstant blieb (Abb. 3-5 b).

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Transgen-Kopienzahl im Kern nicht gleichermaßen zu einem Expressionsanstieg führen muss (Tachibana et al.,

2002; Bode et al., 2003), was die Ergebnisse hinsichtlich der Expressionshöhe erklären kann. Die Effizienz der Transfektion wird jedoch maßgeblich durch die Größe der transfizierten Liposomen und somit durch das Verhältnis aus DNA und Lipofectamine bestimmt (Ross und Hui, 1999; Almofti et al., 2003a, 2003b). Dieser Parameter wurde durch die Veränderung der eingesetzten LF-2000-Menge zusätzlich moduliert (konstantes LF-2000:DNA-Verhältnis und Steigerung der LF-2000-Menge), hatte jedoch negative bzw. nur leicht positive Auswirkungen auf die Messparameter % *Gated* und *X Mean* (Abb. 3-6, Abb. 3-7). Tendenziell konnte erst mit steigender DNA-Menge der % *Gated*-Wert durch höhere LF-2000-Mengen positiv beeinflusst werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Bedingungen für eine Lipofektion insgesamt in dem in dieser Arbeit angewendeten geringen Mengenbereich nicht ideal waren (vgl. dazu Abschnitt 4.3.1). Zusammengefasst konnten für die Expressionsvergleiche der Minicircles und Parentalplasmide im Folgenden zwar relativ geringe DNA-Mengen eingesetzt werden (< 50 fmol), die von der Fa. Invitrogen angegebene Mindestmenge LF-2000 je Ansatz sollte dabei jedoch nicht zur Beeinflussung der Liposomengröße unterschritten werden.

4.3 Transiente Genexpressionsvergleiche von Minicircles und Parentalplasmiden

4.3.1 Die Transfektionseffizienzen von Minicircles und Parentalplasmiden sind vergleichbar

Die Effizienz der Transfektion zirkulärer DNA-Moleküle wird durch die Topologie und die Größe der DNA (Weintraub et al., 1986; Darquet et al., 1999), die der Lipofektion darüber hinaus durch das Verhältnis aus DNA und Lipofectamine (Almofti et al., 2003b) beeinflusst. Eine hohe Effizienz der Liposomenaufnahme ist für eine fast neutrale Ladung und infolgedessen die Bildung vergleichsweise großer Lipoplexe beschrieben (Eastman et al., 1997; Almofti et al., 2003b). Vorgänge, die innerhalb einer Zelle nicht durch einen aktiven Transport unterstützt werden, erfolgen anschließend durch Diffusion, wobei der Diffusionskoeffizient reziprok abhängig von der Partikelgröße ist (Jain, 1987; Darquet et al., 1999). Aufgrund der Kompaktheit der kleineren Minicircles (Tolmachov, 2010) konnte in der vorliegenden Arbeit demnach eine höhere Transfektionseffizienz eines Minicircles relativ zu dem korrespondierenden Parentalplasmid erwartet werden (hier gemessen als Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen einen Tag nach der Transfektion). Das Ausbleiben systematischer Unterschiede (Abb. 3-9) deutet allerdings auf eine untergeordnete Rolle der DNA-Größe hin. Vielmehr waren aufgrund der geringen eingesetzten DNA-Mengen (50 – 170 ng) für die hier durchgeführten MC/PP-Vergleiche die Lipoplexe vermutlich relativ klein

(gemäß Khalil et al., 2006) und die Transfektionsbedingungen folglich nicht optimal (Almofti et al., 2003b). Das kann zu einer allgemein verminderten Transfektionseffizienz beigetragen haben, wodurch die Vorteile der Kompaktheit von Minicircles (Tolmachov, 2010) zumindest in Bezug auf diesen Parameter nicht zum Tragen kamen.

Trotz der genannten Einschränkungen konnte die DNA-Sequenz als einflussreicher Parameter für eine erfolgreiche Lipofektion ausgemacht werden. Die Transfektionseffizienzen der CMV-S/MAR-enthaltenden Vektoren waren gegenüber den Vektoren mit M18-S/MAR bzw. ohne S/MAR-Element trotz identischer DNA-Präparationsmethoden und ähnlicher Größen durchschnittlich um 6,5 % gesenkt (Abb. 3-9). Superhelikale DNA, wie sie hier eingesetzt wurde, kann unterschiedliche Topoisomere bilden, deren Stabilität auch von dem Vorkommen bestimmter Sequenzmotive abhängt (Panyutin et al., 1985; Naylor et al., 1988; Zhabinskaya und Benham, 2011). Beispielsweise können die sog. *A-tracts*, die vermehrt in S/MARs vorhanden sind (Boulikas, 1995; Kipp et al., 2000), Biegungen in die DNA einführen (Goodsell et al., 1993). Es ist also durchaus denkbar, dass eine veränderte Topologie in den hier verwendeten CMV-S/MAR-enthaltenden Vektoren (auch pCMVd2EGFP-basic-basiert, s. Abschnitt 4.4) die DNA-Stabilität relativ gesehen erniedrigte. Durch gezielte Punktmutationen in der CMV-S/MAR-Sequenz könnte die Transfektionseffizienz daher womöglich verbessert werden.

4.3.2 S/MAR-Elemente erhöhen den Anteil d2EGFP-exprimierender Zellen in der transienten Phase nicht

Hinsichtlich des Verlaufs des Anteils d2EGFP-exprimierender Zellen über vier Tage wurde weder ein relevanter Unterschied zwischen S/MAR-losen und S/MAR-enthaltenden pEpi-basierten Vektoren noch zwischen Minicircles und den korrespondierenden Parentalplasmiden festgestellt (Abb. 3-10). Die geringere Größe und das Fehlen der prokaryotischen Sequenzen bei den Minicircles führte in Bezug auf diesen Parameter zu keinem Vorteil gegenüber den Parentalplasmiden (Abb. 3-10), was aufgrund der vergleichbaren Transfektionseffizienzen auch nicht erwartet wurde (vgl. Abschnitt 4.3.1). Darüber hinaus konnte bei den S/MAR-enthaltenden Vektoren nicht ohne Weiteres davon ausgegangen werden, dass sie (ohne Selektionsdruck) in hoher Kopienzahl unmittelbar in das Chromatin aufgenommen und replikationsfähig geworden sein sollten. Erst dies hätte einer Verdünnung durch Zellteilung jedoch entgegen gewirkt (Schübeler et al., 1996; Stehle et al., 2003). Vermutlich herrschte zudem ein großer Vektorüberschuss über die offensichtlich für S/MAR-Episomen bereitstehenden Kernmatrix-Bindestellen. Der Prototyp pEpi-1 wird schließlich mit weniger als 20 Kernkopien etabliert (Piechaczek et al., 1999), es wurden je Loch jedoch etwa $3 \cdot 10^{10}$ Vektormoleküle (Avogadro-Konstante gemäß Andreas et al., 2011) transfiziert, weshalb nicht mit einem besonderen Rückhalt im Kern zu rechnen war.

4.3.3 S/MAR-Elemente können zu einer erhöhten transienten Genexpression führen, wenn sie in einem Minicircle enthalten sind

S/MAR-Elemente unterscheiden sich von Enhancern dahingehend, dass sie ihre Wirkung erst in einer geordneten Chromatinstruktur bzw. bei stabiler Transgenexpression entfalten (Schübeler et al., 1996; Lipps et al., 2003; Girod et al., 2007). Hinsichtlich des Anteils d2EGFP-exprimierender Zellen wurde diese nicht-transiente Natur von S/MAR-Elementen in pEpi-basierten Parentalplasmiden und Minicircles bestätigt (s. Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2). Die Expression eines Transgens wird allerdings durch die Anfälligkeit des Vektors für Silencing-Mechanismen (z.B. Methylierung), welche sich nachweislich durch S/MARs verringern lassen (Argyros et al., 2008), mitbestimmt (Garrick et al., 1998; Wong et al., 2011). Auch transient könnte daher durch die Verwendung von S/MAR-Elementen und das Entfernen der prokaryotischen Sequenzen zumindest die Expressionshöhe beeinflusst werden.

Die Kontrolltransfektionen mit S/MAR-losen Vektoren (MC und PP) wiesen weder bei Verwendung des Reporters GLuc noch bei d2EGFP systematische Expressionsunterschiede zwischen Minicircle und Parentalplasmid auf (Abb. 3-11 a, d). Das alleinige Fehlen des prokaryotischen Anteils im Vektor sowie die für Minicircles erwartete überaus kompakte Struktur (Tolmachov, 2010) boten isoliert betrachtet also keine Vorteile. Bei den S/MAR-enthaltenden Minicircles (CMV- und M18-S/MAR) war hingegen die transiente Genexpressionshöhe gegenüber den korrespondierenden Parentalplasmiden bei beiden Reportern teilweise auf mehr als das Doppelte gesteigert (Abb. 3-11; Abb. 3-12), trotz jeweils identischer Expressionskassetten und vergleichbarer Transfektionseffizienzen (vgl. Abb. 3-8 und Abschnitt 4.3.1). Der CMV-S/MAR-enthaltende Minicircle erreichte sogar durch knapp ein Viertel der transfizierten molaren Menge des entsprechenden Parentalplasids ein relativ um 40 % gesteigertes transientes Expressionslevel (Abb. 3-7 b, d).

Es kann vermutet werden, dass ein- und dasselbe S/MAR-Element dieselben Auswirkungen auf das Finden transkriptionell aktiver Chromatinregionen und die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren hat, unabhängig davon, ob es im Minicircle oder Parentalplasmid enthalten ist. Das bakterielle Rückgrat, das einen Hauptangriffspunkt für zelluläres Silencing darstellt (Nehlsen et al., 2006; Chen et al., 2008), sowie die kompakte Minicircle-Struktur (Tolmachov, 2010) sind demnach zunächst die einzigen offensichtlichen Unterschiede zwischen Minicircles und Parentalplasmiden. Trotzdem reichte dies, wie die Kontrollen belegen, nicht alleinig für eine relative TGE-Erhöhung aus. Erst die Kombination aus einem S/MAR-Element und der Entfernung der prokaryotischen Sequenzen (sprich Minicircle) führte hier zu einer spezifischen, transienten Wirkung, die im Folgenden als „S/MAR-Minicircle-Effekt“ (SMC-Effekt) bezeichnet wird. Auch bei der Etablierung pEpi-basierter Vektoren als Episomen gibt es Hinweise auf einen solchen Effekt. Für die Etablierung von

pEpi-1 ist ein initialer Selektionsdruck notwendig, um Zellen einen Vorteil zu bieten, wenn sie das Plasmid beibehalten (Piechaczek et al., 1999). Minicircles hingegen werden ohne Selektionsdruck etabliert (Nehlsen et al., 2006). Offenbar sind die Abschirmung vor Heterochromatisierung und die nukleäre Retention von S/MAR-Elementen nicht hinreichend ausgeprägt, um auch vollständige Plasmide in großer Kopienzahl effektiv und ohne Einwirkungen von außen (Selektion) vor Silencing-Mechanismen zu schützen, wodurch der SMC-Effekt schließlich bedingt wird. Die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Transgenexpression und Kernkopienzahl kann zukünftig zu einer weiteren Aufklärung des SMC-Effekts beitragen.

Nachdem bereits bei dem Vergleich des Strangtrennungspotentials auf mögliche unterschiedliche Funktionen der beiden verwendeten S/MAR-Elemente hingewiesen wurde (Abschnitt 4.1.2), deuten dies auch die Expressionsanalysen an. Das M18-S/MAR-Element führte im Minicircle zu einer initialen Erhöhung der mittleren d2EGFP-Expression um 30 – 40 % gegenüber den Minicircles ohne bzw. mit CMV-S/MAR (Abb. 3-13 a). Anschließend wurde die Expression jedoch nahezu täglich halbiert. Da für einen S/MAR-enthaltenden Minicircle kein Silencing erwartet wird (Nehlsen et al., 2006), spricht das Ergebnis für eine zellteilungsbedingte Verdünnung der MC_d-M18-Moleküle. Dahingegen war die mittlere d2EGFP-Expression des Minicircles mit CMV-S/MAR weitgehend stabil, initial jedoch niedriger als die der anderen beiden Minicircle-Varianten (Abb. 3-13 a). Für den MC_d-CMV wurde aufgrund der verringerten Transfektionseffizienz ein Stabilitätsproblem vermutet (s. Abschnitt 4.3.1), was sich auch auf die anfängliche Expression auswirken könnte. Im Verlauf der transienten Phase wird der ursprüngliche Nachteil jedoch durch die stabilisierte Expression ausgeglichen. Sollte es gelingen, das Problem des MC_d-CMV auf die Stabilität zu reduzieren und anschließend zu beheben, so kann sich die Verwendung dieses Minicircles potentiell für eine insgesamt erhöhte, stabile Transgenexpression über mehrere Tage eignen.

Bei den Expressionsanalysen fällt insgesamt gesehen auf, dass bei den GLuc-Vektoren die Expression der S/MAR-losen Varianten am höchsten war (Abb. 3-13 c, d), bei den d2EGFP-Vektoren hingegen nicht. Einerseits sind die Messparameter beider Reportersysteme sehr unterschiedlich (gesamte Expression des sekretierten GLuc-Proteins vs. momentane, mittlere Expression d2EGFP-positiver Zellen) und daher nur eingeschränkt vergleichbar. Andererseits ist hier offensichtlich auch ein Einfluss der mRNA-Stabilitäten zu berücksichtigen, der daher im folgenden Abschnitt 4.4 eingehender betrachtet wird.

4.4 Auch in nicht pEpi-basierten Plasmiden kann das CMV-S/MAR-Element zu einer Expressionssteigerung führen

PEpi-basierte Vektoren sind speziell für die Etablierung in Säugerzellen entwickelt worden (Piechaczek et al., 1999). In dieser Arbeit sollte hingegen der transiente Charakter von S/MAR-Elementen und Minicircles untersucht werden, so dass sich auch die Verwendung kommerzieller Vektorsysteme wie pCMV-GLuc (*New England Biolabs*) und pCMVd2EGFP-basic (Qiao, 2009; basiert auf pCMVd2EGFP-Basic der Fa. Clontech) anbot. Der Fokus der Expressionsanalysen sollte hierbei auf dem neuartigen CMV-S/MAR-Element liegen.

Analog zu pEpi-basierten Vektoren wurde der Einfluss der CMV-S/MAR auf die TGE stromabwärts des Reportergens untersucht. Aufgrund des ursprünglichen Isolierungsortes des S/MAR-Elements (stromaufwärts der IE1-Promotorregion) wurden zusätzliche Varianten (Abb. 3-14) sowie dem Vergleich dienende, analoge pEpi-Plasmide kloniert.

Die GLuc-Expression der pEpi-Kontrolle (PP_G-w/o) und des pCMV-GLuc-Plasmids verlief über sechs Wochen nahezu identisch. Im Zellkern wurden demnach vermutlich beide Plasmide mit ähnlichen Raten sowohl exprimiert als auch durch Silencing-Mechanismen abgeschaltet bzw. verdünnt (Reduktion der Expression um etwa 90 % ab dem 4 d-Wert; Abb. 3-15 a). Die CMV-S/MAR bewirkte eine relative Abnahme der GLuc-Expression in pEpi-basierten Vektoren in Abhängigkeit von der S/MAR-Dosis (Abb. 3-15; vgl. auch Abb. 3-11 d, e). Dahingegen führte die S/MAR in den pCMV-GLuc-basierten Plasmiden vor allem direkt nach der Transfektion zu einer signifikanten Expressionssteigerung, die in umgekehrter Wirkung ebenfalls Dosis-abhängig war (bis zu 300 % im Vergleich zu pCMV-GLuc; Abb. 3-16).

Die Vektorgrundkonstrukte PP_G-w/o und pCMV-GLuc unterscheiden sich vor allem hinsichtlich des bakteriellen Rückgrats (Abb. 3-8, Abb. 3-14) und der DNA-Länge und -Sequenz zwischen dem CMV-Promotor und dem GLuc-Gen (Letzteres bei pCMV-GLuc ca. 70 % kürzer; Daten nicht gezeigt). Da die verschiedenen DNA-Sequenzen des Rückgrats zumindest bei den Grundkonstrukten ohne S/MAR nicht zu relevanten Expressionsunterschieden führten, ist ihr Einfluss hier als gering einzuschätzen. Offensichtlicher sind an dieser Stelle die unterschiedlichen stromaufwärts gelegenen DNA-Sequenzen des jeweiligen GLuc-Gens. 5'-Nicht-translatierte Regionen (5'-*untranslated-region*, 5'-UTR) können sich sowohl auf die mRNA-Stabilität als auch auf die Translationseffizienz auswirken und damit die Genexpression beeinflussen (Wang et al., 2005; Shabalina et al., 2006). Da die Transkription in die S/MAR hineinläuft, war die mRNA in den CMV-S/MAR-enthaltenden Vektoren gegenüber den S/MAR-losen Grundkonstrukten verlängert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Erweiterung im Zusammenwirken mit der längeren 5'-UTR der pEpi-basierten GLuc-Plasmide zu einer verminderten Stabilität führte, bei den pCMV-GLuc-Konstrukten hingegen nicht. Im letzteren Fall könnte u.a. sogar eine erhöhte mRNA-Stabilität

eine Expressionssteigerung bedingt haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei den analog durchgeführten d2EGFP-Expressionsvergleichen gemacht, hier allerdings ausnahmslos bei allen Konstrukten: sowohl der Anteil exprimierender Zellen als auch die mittlere Expression wurden durch Einführung der CMV-S/MAR gesenkt (Abb. 3-18, Abb. 3-19). Auch in diesem Fall kann die mRNA-Stabilität zu der Verringerung der Expression geführt haben, zumal die pCMVd2EGFP-basic-basierten Plasmide wiederum eine andere und v.a. längere DNA-Sequenz stromaufwärts des Gens als die pCMV-GLuc-basierten Vektoren hatten (Daten nicht gezeigt). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Orientierungsabhängigkeit der S/MAR in Fusion mit dem jeweiligen Gen: die Umkehr der Orientierung senkte die relative GLuc-Expression um mehr als 80 % (Abb. 3-16), die d2EGFP-Messparameter wurden ebenfalls verringert (Abb. 3-20). Zum Einen stützt dieser Sachverhalt die mRNA-Stabilitätsthese, zumal die Orientierung stromaufwärts des Promotors unerheblich war (Abb. 3-17). Ebenso sollte eine mögliche Beeinflussung der Polyadenylierung, die die mRNA-Stabilität ebenfalls verändern kann, in Betracht gezogen werden (Broll et al., 2010). Zum Anderen scheint in bestimmten Situationen eine Orientierungsabhängigkeit der S/MAR-Funktion gegeben zu sein, da sich die Invertierung des Elements reprimierend auf die Transgenexpression auswirkt (Agarwal et al., 1998; Nehlsen et al., in Druck).

Der oben genannte ‚Dosis-Effekt‘ der CMV-S/MAR lässt sich indes nicht durch die Stabilität der mRNA erklären und deutet auf einen spezifischen Expressionseinfluss der CMV-S/MAR hin. Es ist auffällig, dass das S/MAR-Element lediglich in pCMV-GLuc-Konstrukten mit zunehmender Dosis eine gesteigerte Transgenexpression bewirkte. Dieser positive Effekt tritt offenbar unter vorteilhaften Umständen (z.B. keine Verringerung der mRNA-Stabilität durch Transkription in die S/MAR, hohe Gesamtstabilität des Vektors) auf (vgl. dazu auch ‚NF1-Region‘ in Mariati et al., 2010), weshalb bei Verwendung des CMV-S/MAR-Elements insbesondere auf die Vektor- und mRNA-Stabilität geachtet werden sollte, um eine Steigerung der TGE zu erreichen.

4.5 Mithilfe des *All-In-One*-Konzepts lässt sich die Minicircle-Ausbeute bei der Herstellung um eine Zehnerpotenz steigern

Die Untersuchung der transienten Genexpressionsphase unter Verwendung von Minicircles war in der vorliegenden Arbeit durch die geringe Ausbeute aus der Produktion in *E. coli* EL250 eingeschränkt. Dies machte die Entwicklung eines Minicircle-Herstellungsverfahrens für den Labormaßstab notwendig, das ausreichende Mengen in konstanter Qualität lieferte. Mithilfe des *All-In-One*-Konzepts und der dadurch erzielten, signifikanten Minicircle-Ausbeutesteigerung (mindestens 10x) gelang die Umsetzung dieser Anforderung. Die hier entwickelten pAIO-Vektortypen bieten den Vorteil der Verwendung des

Flp/FRT-Systeme für eine mögliche Kombination mit RMCE-Techniken bzw. den Einsatz heterospezifischer FRT-sites (Nehlsen et al., in Druck). Dazu werden durch die Anwendung der Arabinose-Induktion Nebenprodukte minimiert (vgl. Abb. 3-21) und die Maßstabsvergrößerung ist stark vereinfacht. Letztere wirkte sich in dieser Arbeit sogar positiv auf die Rekombinationseffizienz aus (Abb. 3-28), obwohl in den dargestellten Experimenten zumindest das bakterielle Wachstum maßstabsunabhängig war. Möglicherweise führte die unterschiedliche Belüftung der verwendeten Erlenmeyerkolben (Tolosa et al., 2002) zu einer erhöhten Sterberate im kleineren Maßstab ($V_{\text{Kolben}}:V_{\text{Kultur}} = 2$ bzw. $3,3$). Für eine Maßstabsvergrößerung sollte demnach der Parameter der Sauerstoffversorgung sorgfältig bedacht werden (Gill et al., 2008). Die Rekombinationseffizienz konnte zudem bei Verwendung der pAIO-Vektoren in *E. coli* XL1 Blue MRF' durch eine zusätzliche Arabinose-Induktion gesteigert werden (Abb. 3-28, etwa ein Drittel), wodurch das System potentiell für die Anwendung mehrerer Induktionen in einer Art ‚Fed-Batch-Verfahren‘ geeignet ist.

Nach wie vor stellt die Aufreinigung der Minicircles im Labormaßstab eine Herausforderung dar. Durch Verwendung des *All-In-One*-Konzepts konnte zwar die Verwendung teurer Restriktionsenzyme minimiert werden (Größenunterschiede zwischen MC, MP und PP waren ausreichend), für eine Maßstabsvergrößerung sind die gelelektrophoretische Aufreinigung und die Dichtegradientenzentrifugation (Darquet et al., 1997; Chen et al., 2005) jedoch ungeeignet und zudem sehr arbeitsintensiv. Die von Mayrhofer et al. (2008) beschriebene RBPS-Technologie ist diesen Methoden daher vor allem im größeren Maßstab überlegen und es bieten sich weitere Alternativen an. Das Potential des *improved All-In-One*-Konzepts wurde in dieser Arbeit angedeutet (Abb. 3-31) und auch in der Vergangenheit konnte I-SceI erfolgreich angewendet werden (Chen et al., 2005; Yoon et al., 2009). Daher ist eine Optimierung dieses Systems vielversprechend, so dass aufgrund der mit zunehmender Plasmidgröße schwieriger werdenden Handhabung eine minimale Lösung entwickelt werden sollte (z.B. Entfernung eines AraC-Gens, bicistronische Anordnung des Flpe- und des I-SceI-Gens). Um die notwendige Maßstabsvergrößerung der Produktion und Aufreinigung zu ermöglichen, könnte zudem die Gelelektrophorese analog zu Mayrhofer et al. (2008) durch eine affinitätschromatographische Aufreinigung ersetzt werden. Durch die Nutzung spezifischer S/MAR-Interaktionen mit Matrixproteinen (z.B. immobilisiertes SAF-A; Markus Heine, persönliche Mitteilung) wäre ein Verzicht auf die Verwendung zusätzlicher Sequenzen (LacOs bei Mayrhofer et al., 2008) möglich. Alternativ können die Minicircles in den Säugerzellen selbst hergestellt werden, was unter Verwendung der Variante Flpo bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Nehlsen et al., in Druck). Insgesamt bieten sich auf der Basis der in dieser Arbeit entwickelten *All-In-One*- und *improved All-In-One*-Konzepte demnach vielversprechende Möglichkeiten, um die Limitierungen der Minicircle-Herstellung in Zukunft noch effektiver zu überwinden.

4.6 Fazit und Ausblick

S/MAR-basierte Episomen wie das Prototyp-Plasmid pEpi-1 (Piechaczek et al., 1999) und davon abgeleitete minimale Systeme (Minicircles; Nehlsen et al., 2006; Broll et al., 2010) stellen vielversprechende Vektoren für stabile Transfektionen von Säugerzellen in Industrie und Gentherapie dar. Der Bedarf an weniger zeit- und kostenintensiven Ansätzen wächst jedoch zunehmend, so dass die transiente Genexpression für die Proteinherstellung im großen Maßstab immer beliebter wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende, transiente Expressionsanalysen von pEpi-basierten Minicircles und Parentalplasmiden sowie kommerziell erhältlichen Plasmiden in HEK293-Zellen durchgeführt. Dabei kamen das etablierte hUfN- β M18-S/MAR-Element (Broll et al., 2010) sowie eine neuartige S/MAR-Sequenz (CMV-S/MAR; Wirth, M., *unpublished*) zum Einsatz. Für die Überwindung von Limitierungen in der Minicircle-Herstellung wurde durch Klonierung einer Arabinose-induzierbaren Flpe-Expressionskassette in das Rückgrat von pEpi-Plasmiden der Vektortyp pAIO entwickelt („*All-In-One-Konzept*“) und das Minicircle-Aufreinigungsprotokoll weitergehend optimiert („*improved All-In-One-Konzept*“).

4.6.1 Nutzung von S/MARs in der transienten Phase

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein spezifischer, positiver S/MAR-Einfluss auf die transiente Genexpression nachgewiesen werden („S/MAR-Minicircle-Effekt“), womit sich eine neue, bisher unerwartete Aktivitätsebene für S/MARs abzeichnet. Bisher wird dieser SMC-Effekt auf eine effektive Abschirmung des Minicircles vor Silencing durch die S/MAR zurückgeführt. Eine weitergehende Aufklärung auf molekularer Ebene (z.B. Bestimmung der Kernkopienzahl, Bindungsverhalten an Matrixproteine wie SAF-A) ist insbesondere für das Verständnis der transienten S/MAR-Aktivität von Bedeutung und würde dadurch der Optimierung S/MAR-basierter, transienter Systeme dienen.

Das neuartige CMV-S/MAR-Element besitzt das Potential, die TGE zu stabilisieren (Minicircle) bzw. in Abhängigkeit von der im Vektormolekül enthaltenen S/MAR-Dosis signifikant zu erhöhen (etwa 300 % in pCMV-GLuc). Dabei müssen, sofern die Transkription in die S/MAR hineinläuft, die mRNA-Stabilität und kryptische Polyadenylierungsstellen für eine erfolgreiche TGE beachtet werden. Um derartige Einflüsse zu vermeiden, kann die CMV-S/MAR potentiell auch stromaufwärts des Promotors der Expressionskassette eingesetzt werden.

4.6.2 Übergang von der transienten in die stabile Phase

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die transiente und die stabile Genexpression sich nicht mehr gegenseitig ausschließen, sondern dass vielmehr die Übergänge zwischen beiden Phasen fließend sind. Epigenetische Regulatoren wie S/MARs wurden bisher der stabilen Expression zugeschrieben (Wong et al., 2011) und S/MAR-basierte, nicht-virale Vektoren dementsprechend hinsichtlich einer effizienten Etablierung entwickelt. Durch die neuen Erkenntnisse wird ihr Anwendungsfeld über die Ansätze episomaler Etablierung hinaus erweitert. Insbesondere für die industrielle Herstellung von Pharmaproteinen ist dieser Zugewinn an Flexibilität interessant, da universelle Vektoren für die transiente und stabile Genexpression entwickelt werden können.

Alternativ zu den in pEpi-Vektoren bisher standardmäßig verwendeten IFN-S/MAR-Elementen SAR E und M18 (Piechaczek et al., 1999; Nehlsen et al., 2006; Broll et al., 2010) bietet sich nun auch die CMV-S/MAR an und sollte zukünftig hinsichtlich ihrer Eigenschaften in der stabilen Expressionsphase (Etablierungsrate, Kopienzahl, Expressionshöhe) weitergehend charakterisiert werden.

4.6.3 Herstellung von Minicircles

Das in dieser Arbeit entwickelte *All-In-One*-Konzept ist grundsätzlich für die Minicircle-Produktion im großen Maßstab geeignet und erwirkt eine für Flp/FRT-Systeme vergleichsweise hohe Rekombinationsrate. In Kombination mit einer effizienten Aufreinigungsstrategie (Optimierung des hier vorgestellten *improved All-In-One*-Konzepts und / oder Affinitätschromatographie) kann dieses System den Anforderungen an die für transiente Transfektionen benötigten Minicircle-Mengen gerecht werden. Durch geringfügige Veränderungen der pAIO-Vektoren bieten sich zudem die Möglichkeiten der *in situ*-Herstellung von Minicircles in Säugerzelllinien (Flpo), der Anwendung auf dem Gebiet der Stammzellen (ES- und iPS-Zellen) sowie der Kombination der episomalen Etablierung mit RMCE-Techniken an (Nehlsen et al., in Druck).

5. Material

5.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-Loch-Zellkulturplatten	Nunclon (Nunc)
96-Loch-Mikrotiterplatten	Nunc
96-Loch-Mikrotiterplatten weiß	Berthold
Cryoröhrchen	Nalgene
Dispenserspitzen	Starlab
Drigalskispatel einweg (L-Form)	Neolab
Elektroporationsküvetten	BioRad
Handschuhe einweg	Starlab
Küvetten	Plastibrand
Laboratory ID Tape	Starlab
Pipettenspitzen	Starlab
Plastikröhrchen offen 5 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,2 mL – 50 mL	Greiner Bio-One, Sarstedt, Starlab, TPP
Zellkulturflaschen Easy Flask T25 und T75	Nunc

5.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BDSscience
Elektroporator	Gene Pulser Cell	BioRad
Geldokumentation (UV-Tisch)	UVStar	Biometra
Gelelektrophoresekammern	Horizon 11.14 und 58	Biometra (Life Technologies)
	Perfect Blue Gelsystem Mini S	Peqlab
Handdispenser	Repeat One	Starlab
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubator	Forma Scientific CO ₂	Thermo Scientific
Luminometer	MicroLumat LB96P	EG & G Berthold
Mikroskope	Labovert FS	Leitz
	TMS	Nikon
Mischgerät	Vortex	Omnilab
Netzgerät	Power Pac 200	BioRad
	Power Pac 300	BioRad

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Pipetten	1000 µL, 200 µL, 20 µL	Gilson
	10 µL, 2,5 µL	Eppendorf
	12er Multikanal 20 – 200 µL	Costar
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab
Sterilwerkbänke	SterileGard	The Baker Company
	Herasafe	Thermo Scientific
	MaxiSafe 2000	Thermo Scientific
Thermocycler	T3 Thermocycler	Biometra
	TProfessional Basic Gradient	Biometra
	Cycler	
Waagen	analytic	Sartorius
	universal	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore	Biocell
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5417C	Eppendorf
	CR412	Jouan
	GS-15R	Beckmann
	Megafuge 1.0	Thermo Scientific
	RC5C	Sorvall Instruments

5.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Fermentas, Gibco, Invitrogen, J. T. Baker, Merck, *New England Biolabs*, Peqlab, Promega, Riedel-de-Haen, Roth und Sigma bezogen. Die Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma MWG hergestellt.

5.4 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung	100 mg · mL ⁻¹ Ampicillin Natrium-Salz
<i>Annealing</i> -Puffer 10x	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 7,8), 0,5 M NaCl
Arabinoselösung	20 % (w/v) L-Arabinose
EDTA-Stammlösung (pH 7,8)	0,5 M EDTA
Einfriermedium	95 % (v/v) FBS und 5 % (v/v) DMSO
Ethanol	70 % Ethanol
Ethanol	100 % Ethanol

Lösung	Zutat
FACS-Puffer	2 % (v/v) FBS (hitzeinaktiviert, 2 h, 55 °C) in PBS
FACS-PI-Puffer	FACS-Puffer mit 500 ng · mL ⁻¹ Propidiumiodid
Glukoselösung	2 M D-Glukose
Glycerinlösung	80 % (v/v) Glycerin
Kalziumchlorid-Stammlösung	1 M CaCl ₂
Ladepuffer 6x	0,25 % (w/v) Bromphenolblau (s), 0,25 % (w/v) Xylene Cyanol (s), 30 % (v/v) Glycerin in dH ₂ O
LTE-Puffer	10 mg · mL ⁻¹ Lysozym in TE-Puffer
Magnesiumchlorid-Stammlösung	1 M MgCl ₂ (MgCl ₂ · 6 H ₂ O, s)
Magnesiumsulfat-Stammlösung	1 M MgSO ₄ (MgSO ₄ · 7 H ₂ O, s)
Natriumacetatlösung	3 M Natriumacetat
Natriumchlorid-Stammlösung	5 M NaCl
NE-Puffer	1 mM EDTA in PBS
PBS (pH 7,0)	2,2 g KCl, 80 g NaCl, 14,3 g Na ₂ HPO ₄ , 2,0 g KH ₂ PO ₄ in dH ₂ O (10 L)
Propidiumiodid-Stammlösung	50 µg · mL ⁻¹ Propidiumiodid
RNase A-Lösung	10 mg · mL ⁻¹ RNase A (15 min in kochendem Wasser erhitzt)
STET-Puffer	8 % (w/v) Sukrose, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8,0)
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 7,8) in dH ₂ O
Tris-HCl-Stammlösung (pH 7,5)	1 M Tris-HCl

5.5 Kit-Systeme

Kit	Hersteller
Gaussia Luciferase Assay	<i>New England Biolabs</i>
Mini Prep	Qiagen
QIAquick Gel Extraction	Qiagen

5.6 Nährmedien und Supplemente

Die Nährmedien und Supplemente wurden mit entmineralisiertem Wasser hergestellt und hitzesterilisiert oder sterilfiltriert.

5.6.1 Prokaryotische Nährmedien und Supplemente

Medium	Zusammensetzung
5x M9 Salzlösung	64 g · L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (s), 1,5 % (w/v) KH ₂ PO ₄ (s), 0,25 % (w/v) NaCl (s), 0,5 % (w/v) NH ₄ Cl (s), 1 % (w/v) Hefeextrakt (s)
1x M9 Minimalmedium	20 % (v/v) 5x M9 Salzlösung, 2 mM MgSO ₄ , 0,1 mM CaCl ₂
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton (s), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (s), 0,5 % (w/v) NaCl (s)
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar (s) in LB-Medium
SOB-Medium	2 % (w/v) Trypton (s), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (s), 0,05 % (w/v) NaCl (s), 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	20 mM D-Glukose in SOB-Medium

5.6.2 Eukaryotische Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
DMEM	1 Pckg. DME-Pulvermedium (<i>High Glucose</i> , mit L-Glutamin und 4,5 g · L ⁻¹ D-Glukose, ohne Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat; Gibco), 100 mL HEPES-Lösung, 37,5 g NaHCO ₃ auf 10 L dH ₂ O (pH 7,0 – 7,4)
DMEM++ 10 % FBS	1x Penicillin/Streptomycin (100x, Gibco, I), 1x Glutamin (100x, Gibco, I), 10 % (v/v) FBS in DMEM
DMEM Gln 10 % FBS	1x Glutamin (100x, Gibco, I), 10 % (v/v) FBS in DMEM

5.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Erhalten von
<i>E. coli</i> EL250 (elektrokompetent)	DH10B [λ c857 (<i>cro-bioA</i>) <> <i>araC-P_{BAD}flpe</i>] ¹	RDIF, HZI, Braunschweig ²
<i>E. coli</i> SURE (elektrokompetent)	e14-(<i>McrA</i> -) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10 (chemokompetent)	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1 nupG</i>	RDIF, HZI, Braunschweig

Bakterienstamm	Genotyp	Erhalten von
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (elektrokompetent)	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^P Z\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$	Stratagene

¹ <> bedeutet *cro-bioA* wurde durch *araC-P_{BAD}flpe* substituiert

² Lee et al., 2001

Die Stämme *E. coli* EL250, *E. coli* TOP10 und *E. coli* XL1 Blue MRF' wurden für die Herstellung von Minicircles verwendet. Klonierungen wurden mit den Stämmen *E. coli* XL1 Blue MRF' und *E. coli* SURE durchgeführt.

5.8 Zelllinien

HEK293 *Human Embryonic Kidney* (ATCC CRL-1573)

5.9 Plasmide / Vektoren

d2EGFP-Expressionsplasmide	Beschreibung, Verwendungszweck
pEpi_d2EGFP ⁱ	PP, Kontrolle ohne S/MAR
pEpi-FGM18F_d2EGFP	PP, enthält M18-S/MAR
pEpi-CMV _{CMV} _d2EGFP	PP, enthält CMV-S/MAR
pCMVd2EGFP-basic (Qiao, 2009) ⁱⁱ	Kontrollplasmid ohne S/MAR
pCMV-d2EGFP_CMV _{CMV}	Analogon zu pEpi-CMV _{CMV} _d2EGFP
pCMV-d2EGFP_CMV _{CMV} re	analog zu Vorherigem, CMV-S/MAR invertiert
pCMV _{CMV} _d2EGFP ⁱ	CMV-S/MAR u/s des CMV-Promotors
pCMV _{CMV} _d2EGFP_CMV _{CMV}	enthält zusätzlich zu pCMV-d2EGFP_CMV _{CMV} die CMV-S/MAR u/s des CMV-Promotors
GLuc-Expressionsplasmide	Beschreibung, Verwendungszweck
pEpi_GLuc ⁱ	PP, Kontrolle ohne S/MAR
pEpi-FGM18F_GLuc	PP, enthält M18-S/MAR
pEpi-CMV _{CMV} _GLuc	PP, enthält CMV-S/MAR
pEpi-CMV _{CMV} _GLuc_CMV _{CMV} ARP1 ⁱ	CMV-S/MAR u/s des CMV-Promotors und d/s des GLuc-Gens
pEpi-CMV _{CMV} _GLuc_CMV _{CMV} ARP1re ⁱ	analog Vorherigem, CMV-S/MAR u/s des CMV-Promotors invertiert
pCMV-GLuc (<i>New England Biolabs</i>)	Kontrollplasmid ohne S/MAR

GLuc-Expressionsplasmide	Beschreibung, Verwendungszweck
pCMV-GLuc_CMVMAR ⁱ	Analogon zu pEpi-CMVMAR_GLuc
pCMV-GLuc_CMVMARre ⁱ	analog zu Vorherigem, CMV-S/MAR invertiert
pCMVMAR_GLuc ⁱ	CMV-S/MAR u/s des CMV-Promotors
pCMVMAR_GLuc_CMVMAR ⁱ	enthält zusätzlich zu pCMV-GLuc_CMVMAR die CMV-S/MAR u/s des CMV-Promotors
Minicircle-Produktionsplasmide (AIO)	Beschreibung, Verwendungszweck
pAIOre_GLuc	Herstellung des pEpi_GLuc MCs
pAIO-FGM18F_GLuc	Herstellung des pEpi-FGM18F_GLuc MCs
pAIO-CMVMAR_GLuc	Herstellung des pEpi-CMVMAR_GLuc MCs
pAIOi-CMVMAR_GLuc	Herstellung des pEpi-CMVMAR_GLuc MCs (inklusive I-SceI Verdau)
pAIOre_d2EGFP	Herstellung des pEpi_d2EGFP MCs
pAIO-FGM18F_d2EGFP	Herstellung des pEpi-FGM18F_d2EGFP MCs
pAIO-CMVMAR_d2EGFP	Herstellung des pEpi-CMVMAR_d2EGFP MCs
Andere Plasmide	Beschreibung, Verwendungszweck
pEpi-FGM18F (Broll, 2009) ⁱⁱⁱ	Grundkonstrukt für die Klonierung der pEpi-Expressionsplasmide
pEpi-DelCFG SARF_amp_neu ⁱⁱⁱ	Bereitstellung des Ampicillin-Resistenzgens
pEpi-FGM18F_amp	Austausch der Neo/Kana-Kassette gegen eine Amp-Kassette in pEpi-FGM18F
pEpi-FGM18F_amp_CMV	Austausch des SV40-Promotors gegen einen CMV-Promotor in pEpi-FGM18F_amp
pCMV2Luc (Wirth, M., <i>unpublished</i> , HZI)	Bereitstellung des CMV-S/MAR-Elements
pBAD Myc/His B (Invitrogen)	Grundkonstrukt für die Klonierung der AIO-Kassette
pBAD24-Flpe (Buchholz et al., 1998) ^{iv}	Bereitstellung des Flpe-Gens
pBAD_Flpe Myc/His B	enthält die AIO-Kassette
pBAD_Flpe Myc/His B I-SceI	Zwischenschritt für die Klonierung der I-SceI-Kassette
pBADSc (López et al., 2009) ^v	Bereitstellung des I-SceI-Gens
pBAD_I-SceI His B I-SceI	enthält I-SceI-Kassette
pCMV-GLuc-AIOi-helper	Bereitstellung der I-SceI-Kassette

- ⁱ die markierten Klonierungen wurden in Zusammenarbeit mit Kathrin Goltz (HZI, Braunschweig) unter meiner Anleitung durchgeführt
- ⁱⁱ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Qiao, J., HZI, Braunschweig
- ⁱⁱⁱ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Broll, S., HZI, Braunschweig
- ^{iv} basiert auf pBAD24 (Guzman et al., 1995); pBAD24-Flpe wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Buchholz, F., MPI-CBG, Dresden
- ^v freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Schweizer, H. P., Colorado State University, Colorado

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Plasmide im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert.

5.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Expand Long Template</i> DNA-Polymerase	Roche
<i>Homing Endonuclease</i> I-SceI	<i>New England Biolabs</i>
<i>Large</i> (Klenow) Fragment der DNA-Polymerase I	<i>New England Biolabs</i>
REDTaq TM DNA-Polymerase	Sigma
Restriktionsendonukleasen	<i>New England Biolabs</i> , Roche
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Promega

5.11 Primer und Oligonukleotide

Oligonukleotid (<i>fw</i>)	Sequenz 5' → 3'
2LuchCMV_fw1	ATGTCGCCGATGTGAGTTTC
Ageld2EGFP2_fw	AAAAACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
AgelGLuc_fw	AAAAACCGGTATGGGAGTCAAAGTTCTGTT
AIOCasSeq1_fw	GCGGTATCATTGCAGCACTG
AIOCasSeq2_fw	GAAAGAACCCCGTATTGGCA
AIOCasSeq3_fw	TACTTCTTTAGCGCAAGGGG
AIOCasSeq4_fw	CCGCACAAAAAAGAACGTGTTA
AIOCasSeq5_fw	TCCAATTGAGGAGTGGCAGC
AIOPBAD2_fw	CATGCATAATGTGCCTGTCA
AvrIIAIOpBAD2_fw	AAAACCTAGGCATGCATAATGTGCCTGTCA
AvrIIAIOpBAD3_fw	AAAACCTAGGAGTTACGCTAGGGATAACAGG

Oligonukleotid (<i>fw</i>)	Sequenz 5' → 3'
BglIIICMV ₂ _fw	AAAAAGATCTTCGACCTGCAGTGAATAATA
d2EGFPP_fw	GCTCTCCATCAAAACAAAACGA
d2EGFPSMAR_fw	GCTGTACAAGAAGCTTAGCCAT
Flpe_fw	CATGAGCCAATTTGGTATA
FseICMV ₂ _fw	AAAAGGCCGGCCTCGACCTGCAGTGAATAATA
GLucP_fw	TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTC
I-SceI-Stopp_fw	CCTCCGAAACTTTCTGAAA
I-SceI_fw	ATGCATATGAAAAACATCAA
MluICMV_fw	AAAAACGCGTTAACCGTATTACCGCCATGC
pBADaraBAD_fw	GAGATAACCGTTGGCCTCAA
pBR322_fw	AGGGGGAAACGCCTGGTATC
PciICMV ₂ _fw	AAAAACATGTTTCGACCTGCAGTGAATAATA
PciI-I-SceI-SphI_fw	AAAAACATGTAGTTACGCTAGGGATAACAGGGTAATATAGG-CATGCTTTT
pCMVFRT2_fw	TTTCCCCGTCAAGCTCTAAA
pEpiCMV1_fw	GAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
pEpiCMV2_fw	TATTTGATAGAATTCTGCAGTCGAC
pEpid2EGFP2_fw	CAACGTCTATATCATGGCCG
pEpiGLuc_fw	CTAGCGCTACCGGTATGGGA
pEpiSV40Res_fw	CTTTTTTGGAGGGACGGTATC
SacIFlpe_fw	AAAAGAGCTCCATGAGCCAATTTGGTATA
SacI-I-SceI_fw	AAAAGAGCTCCATGCATATGAAAAACATCAA
XhoICMV ₂ _fw	AAACTCGAGTCGACCTGCAGTGAATAATA
Oligonukleotid (<i>re</i>)	Sequenz 5' → 3'
AIOpBAD2_re	CGACAAACAACAGATAAAACGA
AvrIIAIOpBAD2_re	AAAACCTAGGCGACAAACAACAGATAAAACGA
BglIId2EGFP2_re	AAAAAGATCTATCATGTCTGCTCGAAGCGG
BglIIGLuc_re	AAAAAGATCTAGCGGCCGCTTAGTCACCAC
d2EGFP_re	TCGGCGCGGGTCTTGTAGTT
d2EGFPP_re	TGAAC TTGTGGCCGTTTACG
d2EGFPSMAR_re	GCAATAGCATCACAAATTTAC
Flpe_re	TATGCGTCTATTTATGTAGG
FseICMV ₂ _re	AAAAGGCCGGCCTAATCAATGTCAACATGGCG
GLucP_re	TTGAAGTCTTCGTTGTTCTCGGT
HindIIICMV_re	AAAAAAGCTTGGCTGCAGGAATTCATTGGC
I-SceI-Start_re	TCGGACCGAGGTTCAATTACC

Oligonukleotid (re)	Sequenz 5' → 3'
I-SceI_re	TTTCAGGAAAGTTTCGGAGG
pBADMCS_re	ATGATGATGATGGTCGACGG
pBADXpressCas_re	GTTGCTTCGCAACGTTCAAA
pBR322_re	CGAATCAGACAATTGACGGC
PciI CMVMAR_re	AAAAACATGTTAATCAATGTCAACATGGCG
pEpiCMV2_re	TAAAGCTTGGCTGCAGGAAT
pEpiCMVMAR_re	ATCTAGATCCGGTGGATCCC
pEpiCMVMAR2_re	CGGTAATACGGTTAACGCGT
pEpiM18_re	AGCCTCACTGTCTATCCCCA
pEpiRes_re	TATGAGTAACCTGAGGCTATGGC
SacI Flpe_re	AAAAGAGCTCTATGCGTCTATTTATGTAGG
SacI-I-SceI_re	AAAAGTCGACTTTCAGGAAAGTTTCGGAGG
SalI CMVMAR_re	AAAAGTCGACTAATCAATGTCAACATGGCG
SphI-I-SceI-PciI_re	AAAAGCATGCCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTA-CATGTTTTT
XhoI CMVMAR_re	AAAAC TCGAGTAATCAATGTCAACATGGCG

5.12 DNA-Marker

Marker	Konzentration	Hersteller
1 kb DNA Ladder	500 µg · mL ⁻¹	New England Biolabs
100 bp DNA Ladder	500 µg · mL ⁻¹	New England Biolabs
100 bp DNA-Leiter PLUS	500 µg · mL ⁻¹	Peqlab
MassRuler™ High Range DNA Ladder	42,2 µg · mL ⁻¹	Fermentas
Supercoiled DNA Ladder	0,25 µg · mL ⁻¹	Invitrogen

5.13 Software und Datenbanken

Die Auswertung und Bearbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Word und Microsoft Excel. Für grafische Anliegen wurden die Programme SigmaPlot, QTIPlot, ImageJ und Adobe Photoshop Elements verwendet. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mit dem Programm Cell Quest Pro.

Die bioinformatischen Analysen wurden mit den Programmen WebSIDD (<http://orange.genomecenter.ucdavis.edu/benham/sidd/>) und MAR-Wiz (<http://genomecluster.secs.oakland.edu/marwiz/>) durchgeführt. Als Literatur-, DNA- und Proteinsequenzdatenbank diente NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Für Sequenzalignments wurde das Programm ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) verwendet.

6. Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988) wurde sowohl für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung als auch für die Identifizierung von positiven Klonen in einer Kolonie-PCR verwendet.

6.1.1.1 Kolonie-PCR

In der Kolonie-PCR wurde als *Template* keine aufgereinigte DNA verwendet, sondern eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte entnommen. Die verwendeten Primer flankierten eine Region im neu klonierten Plasmid, die eine eindeutige Unterscheidung zwischen Religanden / negativen Klonen und positiven Klonen zuließ.

Die allgemeine Zusammensetzung eines Kolonie-PCR-Ansatzes sowie das allgemeine Temperaturprogramm sind in Tab. 6-1 aufgeführt.

Tab. 6-1: Allgemeine Zusammensetzung eines Kolonie-PCR-Ansatzes und allgemeines Temperaturprogramm.

Unterstrichene Werte sind je nach verwendetem Primer variabel.

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	
10x REDTaq TM PCR Reaction Buffer	5	95	120	
40 mM dNTPs (10 mM jedes)	1	95	60	
<i>forward</i> -Primer (10 pmol · μL^{-1})	0,5	<u>51</u>	60	} 30 Zyklen
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol · μL^{-1})	0,5	<u>72</u>	<u>60</u>	
REDTaq TM DNA-Polymerase (1 U · μL^{-1})	1	72	600	
dH ₂ O	41	4	300	
		16	∞	

6.1.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Sofern es nicht möglich war, die zu klonierenden DNA-Fragmente aus dem Ursprungsplasmid mit Restriktionsenzymen herauszuschneiden, musste das Fragment mittels PCR amplifiziert werden. Dazu wurden Primer mit Adaptern verwendet, die die gewünschte Restriktionsschnittstelle sowie ein PolyA(4)-Ende enthielten.

Je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes wurde die REDTaq™ DNA-Polymerase (Sigma) oder die *Expand Long Template* (ELT) DNA-Polymerase (Roche) verwendet. Die Zusammensetzung der jeweiligen PCR-Ansätze ist in Tab. 6-2 aufgeführt.

Tab. 6-2: Allgemeine Zusammensetzung eines Amplifikations-PCR-Ansatzes unter Verwendung der *Expand Long Template* (ELT) Polymerase (links) bzw. der REDTaq™ Polymerase (rechts).

Komponente	Volumen [μL]	Komponente	Volumen [μL]
10x ELT Pol Reaction Buffer III	2,5	10x REDTaq™ Reaction Buffer	5
40 mM dNTPs (10 mM jedes)	1	40 mM dNTPs (10 mM jedes)	1
<i>forward</i> -Primer (10 pmol · μL ⁻¹)	1,5	<i>forward</i> -Primer (10 pmol · μL ⁻¹)	0,5
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol · μL ⁻¹)	1,5	<i>reverse</i> -Primer (10 pmol · μL ⁻¹)	0,5
DNA-Polymerase (5 U · μL ⁻¹)	0,25	DNA-Polymerase (1 U · μL ⁻¹)	1
dH ₂ O	17,25	dH ₂ O	41
DNA	1	DNA	1

Das allgemeine Temperaturprofil für beide DNA-Polymerasen ist Tab. 6-3 zu entnehmen.

Tab. 6-3: Allgemeines Temperaturprofil für die Amplifikations-PCR unter Verwendung von Primern mit Adaptern.

Die Elongationstemperaturen sind für beide Enzyme unterschiedlich (*Expand Long Template* DNA-Polymerase 68 °C, REDTaq™ DNA-Polymerase 72 °C). Unterstrichene Werte sind je nach verwendetem Primer variabel.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	
95	120	
95	60	10 Zyklen
<u>51</u>	60	
<u>68 / 72</u>	<u>60</u>	
95	60	20 Zyklen
<u>63</u>	60	
<u>68 / 72</u>	<u>60</u>	
72	600	
4	300	
16	∞	

6.1.2 Restriktionsverdau

Sowohl für die Klonierung als auch für analytische Zwecke wurden Restriktionsendonukleasen (kurz: Restriktionsenzyme) eingesetzt. Diese schneiden ein Plasmid bzw. DNA-Molekül an einer definierten Erkennungssequenz und erlauben somit die Herstellung von Fragmenten mit definierter Länge.

Die Restriktion erfolgte in einem Ansatz, wie in Tab. 6-4 beispielhaft aufgeführt ist. Die eingesetzten DNA-Mengen umfassten mehrere Zehnerpotenzen (wenige Nanogramm bis 100 μg), da der Verdau für die DNA-Konzentrationsbestimmung und Klonierung, ebenso wie

die Linearisierung von Miniplasmid und Parentalplasmid bei der Minicircle-Aufreinigung verwendet wurde. Je nach Bedarf erfolgte der Verdau für 30 min bis 20 h bei der optimalen Inkubationstemperatur des Restriktionsenzym (typisch 37 °C). Die Enzyme wurden ggf. anschließend bei 65 °C oder 80 °C für 20 min inaktiviert.

Tab. 6-4: Beispielhafter Restriktionsansatz im 50 µL-Maßstab (typisch bei der Klonierung).

Komponente	Volumen [µL]
DNA ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	5
10x Puffer	5
Enzym A ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	variabel
Enzym B ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	variabel
dH ₂ O	ad 50 µL

6.1.3 Auffüllreaktion

Die Auffüllreaktion wurde bei einer Klonierung angewendet, wenn die durch Verdau mit Restriktionsenzymen erhaltenen, klebrigen DNA-Enden des Vektorrückgrats und des Inserts nicht übereinstimmten. Auffüllreaktionen erfolgten mit dem *Large* (Klenow) Fragment der DNA-Polymerase I (*New England Biolabs*).

Für eine Reaktion wurden 1 U des Enzyms ($c = 5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) je 1 µg DNA und 33 µM jedes dNTPs ($c = 10 \text{ mM}$) eingesetzt. Als Puffer wurde NEBuffer 2 verwendet. Die Inkubation jedes Ansatzes erfolgte für 15 min bei 25 °C. Anschließend wurde das Enzym bei 75 °C für 20 min inaktiviert.

6.1.4 Dephosphorylierung

Bei der Dephosphorylierung werden die 5'-Phosphatreste von linearen DNA-Fragmenten abgespalten, um eine Religation zu verhindern.

Nach dem Restriktionsverdau wurden bei jeder Klonierung die Fragmente des Plasmidrückgrats dephosphoryliert, um die Anzahl an Religanden zu minimieren. Dafür wurden dem Restriktionsansatz 1 – 2 µL *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) hinzugefügt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 1 – 2 h bei 37 °C.

6.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde für die DNA-Aufreinigung und für analytische Zwecke eingesetzt. Es wurden ausschließlich 1 % Agarosegele verwendet (25 mL bis 50 mL). Der Ladepuffer war sechsfach konzentriert. Die Parameter für einen Lauf waren eine konstante Spannung von 100 V und eine variable Stromstärke. Die Dauer des Laufs richtete sich nach

der gewünschten Auftrennung, dem Volumen des Agarosegels und des Laufpuffers und betrug zwischen 20 min und 60 min.

6.1.6 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel

Sowohl Plasmide und Minicircles als auch DNA-Fragmente geeigneter Größe für Klonierungen wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Für die Aufreinigung von Minicircles wurde teilweise zuerst ein Restriktionsverdau durchgeführt, um das Miniplasmid und das Parentalplasmid zu linearisieren. Dies war insbesondere bei ähnlichen Größen von Minicircle und Miniplasmid nötig.

Die gewünschte DNA-Bande wurde auf einem UV-Tisch mithilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll (Ausnahme: Lösen der Agarose bei 37 °C statt 50 °C) aufgereinigt und schließlich in dH₂O oder TE-Puffer eluiert.

6.1.7 DNA-Aufreinigung durch Präzipitation

Die Präzipitation mittels Natriumacetat und Ethanol wurde sowohl für eine Umpufferung von Enzymsätzen als auch die Fällung von Ligationsansätzen und sehr kleinen DNA-Fragmenten (< 70 bp) verwendet.

Für die Präzipitation wurde jeder Ansatz mit dH₂O auf 100 µL aufgefüllt, mit 250 µL 100 % Ethanol und 10 µL 3 M Natriumacetat versetzt und anschließend für 2 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden danach bei 13 000 rpm und 4 °C für 10 min in der Biofuge Fresco (Heraeus Instruments) zentrifugiert. Es folgten ein bis zwei Waschschrte mit jeweils 500 µL 70 % Ethanol und die Trocknung der DNA unter einem Abzug. Nachdem die DNA vollständig getrocknet war, wurde sie in einer entsprechenden Menge dH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

6.1.8 Isolierung extrachromosomaler DNA aus Bakterien

Extrachromosomale DNA wurde aus Bakterien mithilfe des Mini Prep Kits (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll oder nach der Kochmethode aufgereinigt. Für Letzteres wurde ein Bakterienpellet einer üN-Kultur in 500 µL STET-Puffer aufgenommen, gelöst und anschließend mit 50 µL LTE-Puffer gemischt. Die Suspension wurde 2 – 3 min bei RT und dann für 90 s bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation (13 000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5417C). Mit einem zuvor in RNase-Lösung getauchten, autoklavierten Zahnstocher wurde das Pellet entfernt. Die DNA wurde mit 1 mL 100 % Ethanol und 40 µL 3 M Natriumacetat für 2 min bei RT gefällt und anschließend 10 min bei

4 °C zentrifugiert (13 000 rpm, Biofuge fresco, Heraeus Instruments). Es folgte ein Waschschriff mit 500 µL 70 % Ethanol und die Trocknung unter dem Abzug. Die Elution der mit dem Kit aufgereinigten DNA sowie das Lösen der getrockneten DNA erfolgten mit entsprechenden Mengen dH₂O oder TE-Puffer.

6.1.9 Ligation

Eine Ligation wurde im Anschluss an die Restriktion, Dephosphorylierung und DNA-Aufreinigung mittels T4 DNA-Ligase (Promega) durchgeführt. Dabei wurden, je nach Bedarf, Plasmidrückgrat:Insert-Verhältnisse von 1:1 bis 1:10 eingesetzt. Die Menge des Plasmidrückgrats betrug dabei gewöhnlich ~ 300 ng, wurde allerdings je nach DNA-Konzentration auch variiert. Die Ligation erfolgte bei 16 °C für 16 – 18 h in einem Volumen von 10 µL oder 25 µL.

Ein typischer Ligationsansatz ist in Tab. 6-5 gezeigt.

Tab. 6-5: Typische Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Volumen [µL]
T4 DNA-Ligase	1
10x Ligase-Puffer	1
Plasmidrückgrat	variabel
Insert	variabel
dH ₂ O	ad 10 µL

6.1.10 Klonierung

Jede Klonierung folgte demselben Schema. Insert und Plasmidrückgrat wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, aufgereinigt, ligiert und in einen *E. coli*-Stamm transformiert (sofern nicht anders angegeben: elektrokompente *E. coli* XL1 Blue MRF', Stratagene). Die Identifizierung positiver Klone erfolgte mithilfe von Kolonie-PCR oder Restriktionsverdau. Die Sequenz der neu klonierten Plasmide wurde durch die Verwendung spezifischer Primer in einer Sequenzierungsreaktion (durchgeführt von der Abteilung Genomanalyse, HZI, Braunschweig) bestätigt.

6.1.10.1 pEpi-Grundkonstrukte

Für die Klonierung der beiden pEpi-Grundkonstrukte pEpi-FGM18F_GLuc und pEpi-FGM18F_d2EGFP wurde das Plasmid pEpi-FGM18F (Broll et al., 2010) in drei Schritten verändert.

(A) pEpi-FGM18F_amp: Der Neo/Kana-Lokus des Plasmids pEpi-FGM18F wurde mithilfe der Enzyme HindIII (Fa. NEB) und Drall (Fa. Roche) ausgeschnitten und stattdessen das Ampicillin-Resistenzgen des Plasmids pEpi-DelCFGSAF_amp_neu (Broll, S., HZI, Braunschweig) eingesetzt (Ligation mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert). Positive Klone wurden in einer Kolonie-PCR anhand des Primerpaares pEpiSV40Res_fw und pEpiRes_re identifiziert.

(B) pEpi-FGM18F_amp_CMV: Im zweiten Schritt wurde der SV40-Promotor gegen einen aus dem Plasmid pEpi-FGM18F per PCR amplifizierten CMV-Promotor ausgetauscht (Primerpaar MluICMV_fw, HindIIICMV_re). Dazu wurden Plasmidrückgrat und Amplifikat mit MluI und HindIII (beide NEB) verdaut und mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert ligiert. Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert (Primerpaar pEpiCMV2_fw, pEpiCMV2_re).

(C) pEpi-FGM18F_GLuc und pEpi-FGM18F_d2EGFP: Das GLuc-Gen und das d2EGFP-Gen wurden per PCR aus den Plasmiden pCMV-GLuc (NEB) bzw. pCMVd2EGFP-basic (Qiao, 2009) mit den *forward*-Primern AgelGLuc_fw / Ageld2EGFP2_fw und den *reverse*-Primern BglIIGLuc_re / BglIId2EGFP2_re amplifiziert. Sowohl die PCR-Amplifikate, als auch das Plasmid pEpi-FGM18F_amp_CMV wurden anschließend mit Agel und BglII (beide NEB) verdaut. Die entsprechenden Fragmente wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert ligiert. Positive GLuc-Klone wurden in einer Kolonie-PCR mit den Primern pEpiGLuc_fw und pEpiM18_re identifiziert und durch Sequenzierung bestätigt. Die Identifizierung positiver d2EGFP-Klone erfolgte mittels Restriktionsverdau mit HindIII und MluI (beide NEB).

6.1.10.2 Weitere pEpi-Plasmide

Ausgehend von den beiden pEpi-Grundkonstrukten pEpi-FGM18F_GLuc und pEpi-FGM18F_d2EGFP wurde das M18-S/MAR-Element (A) entfernt und (B) durch das CMV-S/MAR-Element ersetzt. Zusätzlich wurde das CMV-S/MAR-Element stromaufwärts des CMV-Promotors im Plasmid pEpi-CMVMAR_GLuc in der ursprünglichen Orientierung sowie invertiert einkloniert (C).

(A) Aus den Plasmiden pEpi-FGM18F_GLuc und pEpi-FGM18F_d2EGFP wurde das M18-S/MAR-Element durch Restriktionsverdau mit den Enzymen BglII und Sall entfernt. Da pEpi-FGM18F_GLuc zwei Sall-Schnittstellen enthält, musste der Verdau partiell durchgeführt werden. Anschließend wurden die Enden der linearisierten Fragmente mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt (s. Abschnitt 6.1.3) und die Fragmente ligiert. Die Identität der

Kontrollen wurde durch eine Kolonie-PCR mit den Primern pEpiGLuc_fw und pEpiCMVMAR2_re bzw. pEpid2EGFP2_fw und pEpiCMVMAR2_re bestätigt. Es erfolgte anschließend eine Sequenzierung mit dem Primer pEpiCMVMAR2_re. Die resultierenden Kontrollplasmide sind pEpi_GLuc und pEpi_d2EGFP.

(B) Das CMV-S/MAR-Element wurde mithilfe des *forward*-Primers BglIICMVMAR2_fw und des *reverse*-Primers SalICMVMAR_re aus dem Plasmid pCMV2Luc mittels PCR amplifiziert. Der Verdau des Inserts und des Plasmids pEpi-FGM18F_d2EGFP erfolgte mit den Restriktionsenzymen BglII und SalI (beide NEB). Das Plasmid pEpi-FGM18F_GLuc wurde, da es zwei SalI-Schnittstellen enthält, zuerst partiell mit SalI verdaut (Linearisierung) und das linearisierte DNA-Fragment aus einem Agarosegel aufgereinigt. Erst danach erfolgte der zweite Schnitt mit BglII. Die Ligation wurde mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert durchgeführt. Positive Klone wurden anhand einer Kolonie-PCR mit den Primern der Amplifikation des CMV-S/MAR-Elements identifiziert. Die Bestätigung der Sequenz des resultierenden Plasmids pEpi-CMVMAR_d2EGFP erfolgte durch Sequenzierung mit den Primern 2LuchCMV_fw1, pEpiCMV1_fw, pEpid2EGFP2_fw und d2EGFP_re. Das resultierende Plasmid pEpi-CMVMAR_GLuc wurde mit den Primern 2LuchCMV_fw1, pEpiGLuc_fw, pEpiCMV1_fw und SalICMVMAR_re sequenziert.

(C) Das CMV-S/MAR-Element wurde mithilfe des *forward*-Primers PciICMVMAR2_fw und des *reverse*-Primers PciICMVMAR_re aus dem Plasmid pCMV2Luc in einer PCR amplifiziert. Sowohl das Insert als auch das Plasmid pEpi-CMVMAR_GLuc wurden mit dem Restriktionsenzym PciI (NEB) verdaut. Die Ligation erfolgte mit einem fünf- bis zehnfachen molaren Überschuss an Insert. Die Identifikation der positiven Klone wurde mittels Kolonie-PCR mit dem Primerpaar, welches für die Amplifikation des CMV-S/MAR-Elements verwendet wurde, durchgeführt. Die Klone wurden durch Sequenzierung mit den Primern pEpiCMV1_fw und PciICMVMAR_re bestätigt. Die resultierenden Plasmide heißen pEpi-CMVMAR_GLuc_CMVMARP1 und pEpi-CMVMAR_GLuc_CMVMARP1re (CMV-S/MAR stromaufwärts des CMV-Promotors invertiert).

6.1.10.3 pCMV-GLuc-Konstrukte

Das CMV-S/MAR-Element wurde (A) stromaufwärts des CMV-Promotors in dem Plasmid pCMV-GLuc (NEB) und (B) stromabwärts des GLuc-Gens in dem aus Schritt A resultierenden Plasmid sowie dem pCMV-GLuc Grundkonstrukt kloniert.

(A) Ein Fragment CMV-S/MAR – CMV-Promotor wurde mittels der Restriktionsenzyme XhoI und BamHI (beide NEB) aus dem Plasmid pCMV2Luc geschnitten. Das Plasmid pCMV-

GLuc wurde mit den Enzymen HindIII und BglII (beide NEB) verdaut. Nach dem XhoI- bzw. HindIII-Verdau erfolgte eine Auffüllreaktion der klebrigen Enden durch die Klenow-Polymerase wie unter Abschnitt 6.1.3 beschrieben. Anschließend wurde mit dem jeweils zweiten Restriktionsenzym verdaut. Die Ligation erfolgte mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert. Die Identifizierung von positiven Klonen wurde durch eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar GLucP_fw und GLucP_re durchgeführt. Die Bestätigung erfolgte durch Sequenzierung mit dem für die Identifizierung positiver Klone verwendeten Primerpaar sowie dem Primer 2LuchCMV_fw1. Das resultierende Plasmid heißt pCMVMAR_GLuc.

(B) Das CMV-S/MAR-Element wurde aus dem Plasmid pCMV2Luc mithilfe des *forward*-Primers XhoICMVMAR2_fw und des *reverse*-Primers XhoICMVMAR_re in einer PCR amplifiziert. Sowohl das Amplifikat als auch die Plasmide pCMV-GLuc und pCMVMAR_GLuc wurden mit XhoI (NEB) verdaut. Die Ligation erfolgte mit einem fünf- bis zehnfachen molaren Überschuss an Insert. Positive Klone wurden anhand einer Kolonie-PCR mit dem für die Amplifikation des CMV-S/MAR-Elements verwendeten Primerpaares bzw. durch Restriktionsverdau mit dem Enzym XhoI identifiziert und durch Sequenzierung bestätigt. Die daraus resultierenden Plasmide heißen pCMV-GLuc_CMVMAR, pCMV-GLuc_CMVMARre (mit invertiertem CMV-S/MAR-Element) und pCMVMAR_GLuc_CMVMAR.

6.1.10.4 pCMV-d2EGFP-Konstrukte

Analog zu Abschnitt 6.1.10.3 wurde das CMV-S/MAR-Element (A) stromaufwärts des CMV-Promotors in dem Plasmid pCMVd2EGFP-basic (Qiao, 2009) und (B) stromabwärts des d2EGFP-Gens in dem aus Schritt A resultierenden Plasmid sowie dem pCMVd2EGFP-basic Grundkonstrukt kloniert.

(A) Ein Fragment CMV-S/MAR – CMV-Promotor wurde mittels der Restriktionsenzyme BamHI und XhoI (beide NEB) aus dem Plasmid pCMV2Luc geschnitten. Das Plasmid pCMVd2EGFP-basic wurde mit den Enzymen MluI und XhoI (beide NEB) verdaut. Nach dem BamHI- bzw. MluI-Verdau erfolgte eine Auffüllreaktion der klebrigen Enden durch die Klenow-Polymerase wie unter Abschnitt 6.1.3 beschrieben. Anschließend wurde mit dem jeweils zweiten Restriktionsenzym verdaut. Die Ligation erfolgte mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert. Die Identifizierung von positiven Klonen wurde durch eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar d2EGFP_fw und d2EGFP_re durchgeführt. Die Bestätigung erfolgte durch Sequenzierung mit dem für die Identifizierung positiver Klone verwendeten Primerpaar sowie dem Primer 2LuchCMV_fw1. Das resultierende Plasmid heißt pCMVMAR_d2EGFP.

(B) Das CMV-S/MAR-Element wurde aus dem Plasmid pCMV2Luc mithilfe des *forward*-Primers FseICMVd2EGFP_fw und des *reverse*-Primers FseICMVd2EGFP_re in einer PCR amplifiziert. Das Amplifikat und die Plasmide pCMVd2EGFP-basic und pCMVMAR_d2EGFP wurden mit dem Restriktionsenzym FseI (NEB) verdaut und mit einem zehnfachen molaren Überschuss an Insert ligiert. Positive Klone wurden anhand einer Kolonie-PCR mit den Primern d2EGFPd2EGFP_fw und d2EGFPd2EGFP_re identifiziert und mithilfe dieser Primer durch Sequenzierung bestätigt. Die resultierenden Plasmide heißen pCMV-d2EGFP_CMVMAR, pCMV-d2EGFP_CMVMARre (mit invertiertem CMV-S/MAR-Element) und pCMVMAR_d2EGFP_CMVMAR.

6.1.10.5 All-In-One-Kassette

Das Flpe-Gen wurde aus dem Plasmid pBAD24-Flpe (basiert auf pBAD24: Guzman et al., 1995; pBAD24-Flpe: Buchholz et al., 1998) mithilfe des *forward*-Primers SacIFlpe_fw und des *reverse*-Primers SacIFlpe_re in einer PCR amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym SacI (NEB) verdaut. Das ebenfalls mit SacI geschnittene Plasmid pBAD Myc/His B (Invitrogen) und das PCR-Amplifikat wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert ligiert. Positive Klone wurden anhand einer Kolonie-PCR mit den Primern pBADaraBAD_fw und pBADMCS_re identifiziert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern pBADaraBAD_fw und pBADMCS_re. Das daraus erhaltene Plasmid ist pBAD_Flpe Myc/His B.

6.1.10.6 I-SceI-Kassette

Die Klonierung der I-SceI-Kassette erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde stromaufwärts der *All-In-One*-Kassette im Plasmid pBAD_Flpe Myc/His B eine I-SceI-Erkennungssequenz kloniert. Anschließend wurde das Flpe-Gen durch das I-SceI-Gen ersetzt.

Die I-SceI-*site* wurde durch Annealing der beiden Oligonukleotide PciI-I-SceI-SphI_fw und SphI-I-SceI-PciI_re nach dem in Tab. 6-6 angegebenen Protokoll generiert. Das Plasmid pBAD_Flpe Myc/His B und die I-SceI-Erkennungssequenz wurden mit den Restriktionsenzymen PciI und SphI (beide NEB) verdaut. Die Ligation erfolgte mit einem zehnfachen molaren Überschuss an Insert. Die Identifizierung von positiven Klonen wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern pBR322_fw und pBR322_re durchgeführt. Das resultierende Plasmid ist pBAD_Flpe Myc/His B I-SceI.

Tab. 6-6: Zusammensetzung des Annealing-Ansatzes für die Klonierung der I-SceI-Erkennungssequenz und Temperaturprofil für das Annealing.

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
PciI-I-SceI-SphI_fw (100 pmol · μL ⁻¹)	1	95	5	
SphI-I-SceI-PciI_re (100 pmol · μL ⁻¹)	1	95 (-1 / Zyklus)	1	→ 24 Zyklen
10x Annealing Buffer	10	71,1	30	
dH ₂ O	88	71 (-1 / Zyklus)	1	→ 47 Zyklen
		4	5	
		16	∞	

Im nächsten Schritt wurde das Gen I-SceI aus dem Plasmid pBADScE (López et al., 2009) mithilfe des Primerpaares SacI-I-SceI_fw und SacI-I-SceI_re amplifiziert. Das Amplifikat und das Plasmid pBAD_Flpe Myc/His B I-SceI wurden mit SacI (NEB) verdaut, aufgereinigt und mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert ligiert. Positive Klone wurden in einer Kolonie-PCR anhand des *forward*-Primers I-SceI_fw und des *reverse*-Primers I-SceI_re identifiziert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern pBADaraBAD_fw, pBADXpressCas_re und I-SceI_fw. Das resultierende Plasmid ist pBAD_I-SceI His B I-SceI.

6.1.10.7 pAIO-Plasmide

Die *All-In-One*-Kassette wurde aus dem Plasmid pBAD_Flpe Myc/His B mithilfe des *forward*-Primers AvrIIAIOpBAD2_fw und des *reverse*-Primers AvrIIAIOpBAD2_re in einer PCR amplifiziert. Sowohl das Amplifikat als auch die entsprechenden pEpi-Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzym AvrII (NEB) verdaut. Nach Fertigstellung des ersten pAIO-Plasmids (pAIO-CMVMar_GLuc) wurde zusätzlich die *All-In-One*-Kassette aus dem fertigen Plasmid mittels AvrII ausgeschnitten. Beide Fragmente (Insert und Plasmidrückgrat) wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss an Insert ligiert und danach in elektrokompente *E. coli* XL1 Blue MRF' (Stratagene) bzw. *E. coli* SURE (Stratagene) transformiert. Positive Klone wurden anhand einer Kolonie-PCR mit den Primern Flpe_fw und Flpe_re identifiziert. Die Bestimmung der Orientierung der Kassette im pAIO-Vektor erfolgte über Sequenzierung. Dabei kamen folgende Primer zur Anwendung: AIOCasSeq1_fw, AIOCasSeq2_fw, AIOCasSeq3_fw, AIOpBAD2_fw, Flpe_fw, pEpiCMVMar_re, pEpiCMVMar2_re, pEpi2EGFP2_fw, pEpiGLuc_fw, pEpiRes_re. Die resultierenden Plasmide sind pAIOre_GLuc, pAIO-CMVMar_GLuc, pAIO-FGM18F_GLuc, pAIOre_d2EGFP, pAIO-CMVMar_d2EGFP und pAIO-FGM18F_d2EGFP.

6.1.10.8 pAIOi-CMV_{MAR}_GLuc

Die Klonierung des Plasmids pAIOi-CMV_{MAR}_GLuc wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die I-SceI-Kassette wurde zunächst per PCR amplifiziert und in einen Zwischenvektor (pCMV-GLuc) kloniert (A), anschließend wurde sie ausgeschnitten und weiter in das Plasmid pAIO-CMV_{MAR}_GLuc kloniert (B).

(A) Die I-SceI-Kassette wurde aus dem Plasmid pBAD_I-SceI His B I-SceI mittels des *forward*-Primers AvrIIAIOpBAD3_fw und des *reverse*-Primers AvrIIAIOpBAD2_re in einer PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte ein Verdau mit den Restriktionsenzymen AvrII und AclI (beide NEB), wobei Letzteres lediglich Reste des für die PCR eingesetzten Plasmids zerschneiden sollte. Das Plasmid pCMV-GLuc wurde ebenfalls mit AvrII verdaut. Die Ligation erfolgte mit einem zwei- bis zehnfachen molaren Überschuss an Insert und wurde anschließend in *E. coli* SURE Zellen (Stratagene) transformiert. Die Identifikation positiver Klone wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern I-SceI_fw und I-SceI_re durchgeführt. Die Bestätigung der Sequenz erfolgte durch Sequenzierung mit den Primern pBR322_re, AIOCasSeq2_fw, I-SceI_fw, pCMVFRT2_fw, AIOCasSeq4_fw, AIOpBAD2_fw, AIOpBAD2_re, I-SceI_re und I-SceI-Start_re. Das resultierende Plasmid ist pCMV-GLuc-AIOi-helper.

(B) Das Plasmid pAIO-CMV_{MAR}_GLuc wurde partiell mit AvrII verdaut, um es zu linearisieren. Die Ligation mit dem Insert (I-SceI-Kassette aus pCMV-GLuc-AIOi-helper, AvrII verdaut) erfolgte mit einem dreifachen molaren Überschuss des Inserts. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* SURE Zellen (Stratagene) transformiert. Die Identifizierung positiver Klone wurde in einer Kolonie-PCR mit den Primern I-SceI_fw und I-SceI_re vorgenommen. Der Ort (stromaufwärts oder -abwärts der *All-In-One*-Kassette) und die Orientierung wurden durch HindIII-Verdau ermittelt. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern pBR322_re, AIOCasSeq1_fw, AIOCasSeq3_fw, AIOpBAD3_fw, I-SceI_fw, AIOCasSeq4_fw, AIOCasSeq5_fw, I-SceI-Start_re, I-SceI-Stopp_fw.

6.2 Mikrobiologische Methoden

6.2.1 Transformation

Die Transformation von Plasmiden erfolgte mittels Elektroporation (*E. coli* XL1 Blue MRF', *E. coli* SURE, *E. coli* EL250) oder Hitzeschocktransformation (*E. coli* TOP10).

Für die Elektroporation wurden 5 µL bzw. 20 µL des elektrokompetenten *E. coli* Stammes mit 30 µL bzw. 15 µL der DNA-Lösung für mindestens 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation in einer 0,2 mm (2,5 kV) bzw. einer 0,1 mm (1,7 kV) Küvette bei 200 Ω und 25 µF. Sofort wurden die Bakterien in 1 mL auf 37 °C bzw. 30 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 600 rpm und 37 °C bzw. 30 °C im Eppendorf Thermomixer inkubiert.

Für die Hitzeschocktransformation in chemokompetente *E. coli* TOP10 Zellen wurden 50 µL Zellsuspension mit 0,5 µL DNA-Lösung gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 60 s bei 42 °C. Anschließend wurde das Gemisch erneut für 2 min auf Eis gehalten und schließlich in 1 mL SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Eppendorf Thermomixer inkubiert.

Die Plattierung erfolgte jeweils auf Selektivagarplatten, welche bei 37 °C bzw. 30 °C üN inkubiert wurden.

6.2.2 Herstellung eines Glycerin-Stocks

Ein entsprechender *E. coli*-Klon wurde üN bei 180 rpm und 30 °C oder 37 °C in LB-A oder LB-GA Medium inkubiert. 750 µL der üN-Kultur wurden am nächsten Tag mit 250 µL 80 % Glycerin gemischt und bei -70 °C eingefroren.

6.2.3 Minicircle-Produktion

6.2.3.1 Optimierung der Arabinose-Induktion

Die Optimierung der Arabinose-Induktion wurde mit dem Plasmid pAIO-CMV_{MAR}_GLuc in den beiden Stämmen *E. coli* XL1 Blue MRF' und *E. coli* TOP10 durchgeführt. Sie erfolgte in drei Schritten.

(A) Es wurde eine Konzentrationsreihe von $2 \cdot 10^{-6}$ % bis 2 % L-Arabinose getestet. Dazu wurden Übernachtskulturen beider *E. coli*-Stämme von einer Agarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte im 50 mL-Maßstab (100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen) bei einer Temperatur von 37 °C und 180 rpm Schüttelgeschwindigkeit.

Die Übernachtskulturen wurden 15 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und mit dem halben Volumen LB-Medium gewaschen. Es folgten ein zweiter, analoger Zentrifugationsschritt und

die Aufnahme in einem Volumen M9 Minimal Medium. Anschließend wurden jeweils 2 mL Kultur mit den entsprechenden Konzentrationen L-Arabinose versetzt und in Kulturröhrchen bei 30 °C und 180 rpm für 150 min geschüttelt. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Analyse der Proben.

(B) Mit der optimierten L-Arabinose-Konzentration wurde anschließend eine Zeitreihe durchgeführt. Dazu wurde bis zur Aufnahme in M9 Minimal Medium analog zu (A) vorgegangen. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,3 % L-Arabinose. Jeweils 2 mL Kultur wurden in Kulturröhrchen bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. In den ersten 6,5 h nach Induktion wurden jede 30 min Proben genommen. Die letzte Probe wurde nach 22,5 h genommen. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Analyse der Proben.

(C) Dieser Optimierungsschritt wurde nur mit *E. coli* XL1 Blue MRF' durchgeführt. Bis zur Aufnahme der Bakterien in M9 Minimal Medium wurde analog zu Punkt (A) vorgegangen. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,3 % L-Arabinose im 50 mL-Maßstab und eine fast 24-stündige Inkubation bei 30 °C und 180 rpm Schüttelgeschwindigkeit. Nach der ersten Induktion wurden die Zentrifugation, die Aufnahme in frischem M9 Minimal Medium, die Induktion mit 0,3 % L-Arabinose und die Inkubation vollständig wiederholt. Zwischen jedem Schritt wurden Proben für die Analytik genommen.

6.2.3.2 Herstellung von Minicircles

Die Übernachtskulturen der entsprechenden *E. coli* Stämme wurden von einer Agarplatte oder einer Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte in LB-A Medium in Maßstäben von 50 mL, 100 mL oder 300 mL in Erlenmeyerkolben ohne Schikanen (100 mL, 500 mL bzw. 1000 mL) bei einer Temperatur von 30 °C (*E. coli* EL250) oder 37 °C (*E. coli* XL1 Blue MRF') und 180 rpm Schüttelgeschwindigkeit.

Die Übernachtskulturen wurden nach 16 h bis 18 h Inkubation für 15 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und die Pellets in einem halben Volumen LB-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt analog und die Aufnahme des Pellets in einer der Übernachtskultur entsprechenden Menge M9 Minimal Medium. Die Expression der Flp- bzw. Flpe-Rekombinase wurde durch Zugabe von 0,3 % L-Arabinose induziert. Die weitere Inkubation erfolgte für 2,5 h (*E. coli* EL250) bzw. über Nacht (< 24 h, *E. coli* XL1 Blue MRF').

Für einen zweiten Induktionsschritt wurde die Kultur nach der ersten Induktion bei 3000 g für 15 min bis 35 min zentrifugiert und das Pellet in frischem M9 Minimal Medium mit 0,3 % L-Arabinose aufgenommen. Bei nur einer Induktion wurden die Zellen nach der Zentrifugation bei -20 °C eingefroren.

Für weitere Analysen wurden vor jeder Induktion, sowie zwischen zwei Induktionsschritten und am Ende der Kultivierung jeweils Proben genommen.

6.2.4 Anwendung des *improved All-In-One*-Konzepts

Die Übernachtskulturen der entsprechenden *E. coli* XL1 Blue MRF'-Stämme wurden von einer Agarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte in LB-A oder LB-GA Medium im 50 mL-Maßstab (100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen) bei einer Temperatur von 37 °C und 180 rpm Schüttelgeschwindigkeit.

Die Übernachtskulturen wurden nach 18 h bis 19 h Inkubation für 15 min bei 3000 *g* und 4 °C zentrifugiert und die Pellets in einem halben Volumen LB-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt analog und die Aufnahme des Pellets in einer der Übernachtskultur entsprechenden Menge M9 Minimal Medium. Mittels 0,3 % L-Arabinose wurde die Induktion durchgeführt. Die Kultur wurde zunächst für 22,5 h bei 30 °C und anschließend für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Während der zweiten Inkubation wurden jeweils Kulturproben nach 2 h, 5,5 h und 24 h für die weitere Analyse entnommen.

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Auftauen von HEK293-Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden zügig in einem Wasserbad (37 °C) aufgetaut und anschließend mit einer entsprechenden Menge DMEM++ 10 % FBS gemischt (z.B. 1 mL Zellsuspension + 4 mL Medium). Diese Suspension wurde entweder 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dann ein Mediumwechsel durchgeführt oder es erfolgte eine sofortige Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) bei RT und anschließend die Zugabe von frischem Medium und eine entsprechende Kultivierung.

6.3.2 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in T25- oder T75-Zellkulturflaschen oder 24-Loch-Platten mit DMEM ++ 10 % FBS oder DMEM Gln 10 % FBS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sie wurden zweimal pro Woche bei 90 – 100 % Konfluenz jeweils 1:5 passagiert. Um die Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes zu lösen, wurde sie mit 0,2 Volumen NE-Puffer abgelöst bzw. durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

6.3.3 Herstellung einer Kryokultur von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden wie beim Passagieren von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst und in einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen wurden in auf Eis gekühltem Einfriermedium

suspendiert (z.B. 2 mL Medium für eine T25 Zellkulturflasche). Jeweils 0,5 mL oder 1 mL der Suspension wurden in Kryoröhrchen gefüllt und üN in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -70 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

6.3.4 Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mittels Lipofectamine-2000 in 24-Loch-Platten. Dafür wurde einen bzw. drei Tage vor der Transfektion eine geeignete Anzahl an Zellen in DMEM ++ 10 % FBS Medium in die Löcher ausgesät.

Für die Transfektion wurden i.d.R. 2 µg Lipofectamine-2000 (Ausnahme Optimierung des Transfektionsprotokolls) in 50 µL DMEM für 5 min bei RT inkubiert. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde ebenfalls in 50 µL DMEM gelöst und anschließend mit dem Lipofectamine-2000-Ansatz gemischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei RT. Das Medium wurde aus den 24-Loch-Platten abgesaugt und jeweils 100 µL des Transfektionsansatzes auf die Zellen pipettiert. Zu jedem Loch wurden dann 900 µL DMEM Gln 10 % FBS gegeben. Es erfolgte ein Mediumwechsel 4 h bzw. 24 h nach der Transfektion in jedem Loch. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Optimierung des Transfektionsprotokolls wurden, abweichend vom allgemeinen Protokoll, unterschiedliche Lipofectamine-2000-Mengen eingesetzt (0,05 µg bis 3,5 µg).

6.3.5 Durchflusszytometrie

Die Expression von HEK293-Zellen, die mit d2EGFP-haltigen Vektoren transfiziert wurden, wurde am FACSCalibur durchflusszytometrisch gemessen. Dafür wurde das Medium in jedem Loch der 24-Loch-Platte abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 0,5 mL PBS aufgenommen (Lösen durch Auf- und Abpipettieren). Die Suspension wurde in ein auf Eis gekühltes FACS-Röhrchen mit 0,5 mL FACS-Puffer pipettiert und bei 1000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 0,4 mL FACS-PI-Puffer aufgenommen. Am FACSCalibur wurden je Ansatz 10 000 vitale Zellen vermessen.

6.3.6 Luminometrische Messungen

6.3.6.1 Gaussia Luciferase-Messungen

Für die Luciferase-Messungen wurde das Gaussia Luciferase Assay Kit (Fa. NEB) verwendet. Die Proben der Transfektionen wurden jeweils in 1,5 mL oder 2 mL

Kulturgefäßen oder in Mikrotiterplatten gesammelt, zentrifugiert (1000 rpm, 5 min) und der Überstand bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Alle Schritte der Vorbereitung der Messungen wurden auf Eis und in Mikrotiterplatten durchgeführt. Von allen Proben wurde eine 1:10 Verdünnung in dH₂O hergestellt (die sog. Masterplatte). Die Masterplatte wurde anschließend in dH₂O in drei Stufen weiterverdünnt (gewöhnlich 1:100, 1:500, 1:1000 als Endverdünnung). Von diesen Stufen wurden jeweils 20 µL in weiße Mikrotiterplatten gegeben, in denen 80 µL dH₂O vorgelegt worden waren.

Die Messung erfolgte im MicroLumat LB96P (EG & G Berthold). Für die Messungen wurde eine entsprechende Menge *Working Solution* gemäß Herstellerprotokoll der Fa. *New England Biolabs* hergestellt. Diese Lösung wurde anschließend 1:1 mit dH₂O verdünnt, da das Gerät statt 50 µL *Working Solution* 100 µL verwendete.

6.3.6.2 Bestimmung der Halbwertszeit von Gaussia Luciferase

Für die Bestimmung der Halbwertszeit der Gaussia Luciferase wurden GLuc-haltige Überstände eines älteren Transfektionsexperiments (Expression aus den ersten 72 h einer Transfektion) 1:1 und 1:3 mit DMEM Gln 10 % FBS verdünnt und diese Mischung in einer 24-Loch-Platte sowohl als Überstand von HEK293-Zellen als auch ohne Zellen für eine Woche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Fast jeden Tag wurden Proben des Überstands genommen. Der Messfehler, der durch die Verdunstung des Überstands und die Probenahme auftreten konnte, betrug höchstens 10 %. Die Vermessung der Proben erfolgte analog zu 6.3.6.1.

6.4 Sonstige Methoden

6.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte bei ausreichend hohen Konzentrationen photometrisch am NanoDrop gemäß Herstellerprotokoll.

6.4.2 Densitometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Auswertung der Rekombinationseffizienz der Minicircle-Herstellung sowie für die Konzentrationsbestimmung bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde die Messung densitometrisch durchgeführt. Dazu wurde die zu vermessende, linearisierte DNA zusammen mit dem Marker MassRuler in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mithilfe des Programms ImageJ. Anhand der

definierten DNA-Menge je Markerbande konnten Rückschlüsse auf die DNA-Konzentration der zu vermessenden Probe gezogen werden.

Für die Optimierung der Minicircle-Herstellung wurde ebenfalls die densitometrische Methode verwendet. Hier wurde jedoch teilweise auf eine Linearisierung der Plasmide verzichtet, so dass lediglich ein relatives Intensitätsverhältnis der Banden von Minicircle, Miniplasmid und Parentalplasmid bestimmt werden konnte.

7. Literatur

Agarwal, M., Austin, T. W., Morel, F., Chen, J., Böhnlein, E., Plavec, I.: **Scaffold attachment region-mediated enhancement of retroviral vector expression in primary T cells.** J Virol (1998) 72 (5): 3720-8.

Akita, H., Harashima, H.: **Advances in non-viral gene delivery: using multifunctional envelope-type nano-device.** Expert Opin Drug Deliv (2008) 5 (8): 847-59.

Al-Dosari, M. S., Gao, X.: **Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress.** AAPS J (2009) 11 (4): 671-81.

Allen, G. C., Hall, G. Jr., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A. K., Thompson, W. F.: **High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco.** Plant Cell (1996) 8 (5): 899-913.

Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E.: **Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis.** Proc Natl Acad Sci U S A (1964) 51: 786-94.

Almofti, M. R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Baba, Y., Kiwada, H.: **Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization.** Arch Biochem Biophys (2003a) 410 (2): 246-53.

Almofti, M. R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Li, W., Kiwada, H.: **Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum.** Mol Membr Biol (2003b) 20 (1): 35-43.

Amati, B. B., Gasser, S. M.: **Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold.** Cell (1988) 54 (7): 967-78.

Amati, B., Gasser, S. M.: **Drosophila scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts.** Mol Cell Biol (1990) 10 (10): 5442-54.

Amati, B., Pick, L., Laroche, T., Gasser, S. M.: **Nuclear scaffold attachment stimulates, but is not essential for ARS activity in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the *Drosophila* ftz SAR.** EMBO J (1990) 9 (12): 4007-16.

Andreas, B., Azuma, Y., Bartl, G., Becker, P., Bettin, H., Borys, M., Busch, I., Gray, M., Fuchs, P., Fujii, K., Fujimoto, H., Kessler, E., Krumrey, M., Kuetgens, U., Kuramoto, N., Mana, G., Manson, P., Massa, E., Mizushima, S., Nicolaus, A., Picard, A., Pramann, A., Rienitz, O., Schiel, D., Valkiers, S., Waseda, A.: **Determination of the avogadro constant by counting the atoms in a ^{28}Si crystal.** Phys Rev Lett (2011) 106 (3): 030801.

Andreas, S., Schwenk, F., Küter-Luks, B., Faust, N., Kühn, R.: **Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage Φ C31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells.** Nucleic Acids Res (2002) 30 (11): 2299-306.

Andrews, B. J., Proteau, G. A., Beatty, L. G., Sadowski, P. D.: **The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences.** Cell (1985) 40 (4): 795-803.

Argyros, O., Wong, S. P., Niceta, M., Waddington, S. N., Howe, S. J., Coutelle, C., Miller, A. D., Harbottle, R. P.: **Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector.** Gene Ther (2008) 15 (24): 1593-605.

Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C., Schmidt, S. B., Bode, J., Benham, C., Lipps, H. J.: **Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix.** Nat Cell Biol (2000) 2 (3): 182-4.

Baldi, L., Muller, N., Picasso, S., Jaquet, R., Girard, P., Thanh, H. P., Derow, E., Wurm, F. M.: **Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production.** Biotechnol Prog (2005) 21 (1): 148-53.

Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., Wurm, F. M.: **Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives.** Biotechnol Lett (2007) 29 (5): 677-84.

Beardsley, T.: **Gene therapy setback.** Sci Am (2000) 282 (2): 36-7.

Belmont, A. S., Bruce, K.: **Visualizazion of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure.** J Cell Biol (1994) 127 (2): 287-302.

Benbow, R. M.: **Chromosome structures.** Sci Prog (1992) 76 (301-302 Pt 3-4): 425-50.

Benham, C. J.: **Elastic model of supercoiling.** Proc Natl Acad Sci U S A (1977) 74 (6): 2397-401.

Benham, C. J.: **Sites of predicted stress-induced DNA duplex destabilization occur preferentially at regulatory loci.** Proc Natl Acad Sci U S A (1993) 90 (7): 2999-3003.

Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T., Bode, J.: **Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions.** J Mol Biol (1997) 274 (2): 181-96.

Bentley, K. J., Gewert, R., Harris, W. J.: **Differential efficiency of expression of humanized antibodies in transient transfected mammalian cells.** Hybridoma (1998) 17 (6): 559-67.

Berrios, M., Osheroff, N., Fisher, P. A.: **In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction.** Proc Natl Acad Sci U S A (1985) 82 (12): 4142-6.

Bi, C., Benham, C. J.: **WebSIDD – Computational prediction of stress-induced duplex destabilized sites in superhelical DNA.** User Manual for WebSIDD (2003) <http://orange.genomecenter.ucdavis.edu/benham/sidd/papers.php>.

Bigger, B. W., Tolmachov, O., Collombet, J. M., Fragkos, M., Palaszewski, I., Coutelle, C.: **An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy.** J Biol Chem (2001) 276 (25): 23018-27.

Birling, M. C., Gofflot, F., Warot, X.: **Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome.** Methods Mol Biol (2009) 561: 245-63.

Blasquez, V. C., Sperry, A. O., Cockerill, P. N., Garrard, W. T.: **Protein:DNA interactions at chromosomal loop attachment sites.** Genome (1989) 31 (2): 503-9.

Blomquist, P., Li, Q., Wrangé, O.: **The affinity of nuclear factor 1 for its DNA site is drastically reduced by nucleosome organization irrespective of its rotational or translational position.** J Biol Chem (1996) 271 (1): 153-9.

Blomquist, P., Belikov, S., Wrangé, O.: **Increased nuclear factor 1 binding to its nucleosomal site mediated by sequence-dependent DNA structure.** Nucleic Acids Res (1999) 27 (2): 517-25.

Blow, J. J., Dutta, A.: **Preventing re-replication of chromosomal DNA.** Nat Rev Mol Cell Biol (2005) 6 (6): 476-86.

Bode, J., Gómez-Lira, M. M., Schröter, H.: **Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated.** Eur J Biochem (1983) 130 (3): 437-45.

Bode, J., Pucher, H. J., Maass, K.: **Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon-beta genes in a mouse host cell.** Eur J Biochem (1986) 158 (2): 393-401.

Bode, J., Maass, K.: **Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions.** Biochemistry (1988) 27 (13): 4706-11.

Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C., Kohwi-Shigematsu, T.: **Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs.** Science (1992) 255 (5041): 195-7.

Bode, J., Schlake, T., Ríos-Ramírez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., Klehr-Wirth, D.: **Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci.** Int Rev Cytol (1995) 162A: 389-454.

Bode, J., Benham, C., Knopp, A., Mielke, C.: **Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (SMAR elements).** Crit Rev Eukaryot Gene Expr (2000) 10 (1): 73-90.

Bode, J., Fetzer, C. P., Nehlsen, K., Scinteie, M., Hinrichs, B. H., Baiker, A., Piechaczek, C., Benham, C. J., Lipps, H. J.: **The hitchhiking principle: optimizing episomal vectors for the use in gene therapy and biotechnology.** Gene Ther Mol Biol (2001) 6: 33-46.

Bode, J., Götze, S., Ernst, E., Hüsemann, Y., Baer, A., Seibler, J., Mielke, C.: **Architecture and utilization of highly expressed genomic sites.** In S.C. Makrides (Ed.) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells (2003) S. 551-572, Elsevier, Amsterdam; Kapitel 20.

Bode, J., Winkelmann, S., Götze, S., Spiker, S., Tsutsui, K., Bi, C., A K P, Benham, C.: **Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy.** J Mol Biol (2006) 358 (2): 597-613.

Bollag, R. J., Waldman, A. S., Liskay, R. M.: **Homologous recombination in mammalian cells.** Annu Rev Genet (1989) 23: 199-225.

Boulikas, T.: **Chromatin domains and prediction of MAR sequences.** Int Rev Cytol (1995) 162A: 279-388.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. P.: **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.** Proc Natl Acad Sci U S A (1995) 92 (16): 7297-301.

Brenner, M. K., Okur, F. V.: **Overview of gene therapy clinical progress including cancer treatment with gene-modified T-cells.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2009) 675-81.

Broll, S.: **Selbstreplizierende nicht-virale Episomen (Minicircles): Expressionseigenschaften und Etablierung im Zellkern.** Dissertation (2009) Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland.

Broll, S., Oumard, A., Hahn, K., Schambach, A., Bode, J.: **Minicircle performance depending on S/MAR-nuclear matrix interactions.** J Mol Biol (2010) 395 (5): 950-65.

Buchholz, F., Angrand, P. O., Stewart, A. F.: **A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs.** Nucleic Acids Res (1996) 24 (15): 3118-9.

Buchholz, F., Angrand, P. O., Stewart, A. F.: **Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis.** Nat Biotechnol (1998) 16 (7): 657-62.

Buttrick, P. M., Kass, A., Kitsis, R. N., Kaplan, M. L., Leinwand, L. A.: **Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo.** Circ Res (1992) 70 (19): 193-8.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., Fischer, A.: **Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.** Science (2000) 288 (5466): 669-72.

Celniker, S. E., Campbell, J. L.: **Yeast DNA replication in vitro: initiation and elongation events mimic in vivo processes.** Cell (1982) 31 (1): 201-13.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C.: **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** Science (1994) 263 (5148): 802-5.

Check, E.: **A tragic setback.** Nature (2002) 420 (6912): 116-8.

Chen, Y., Zhao, M., Li, Z. P., He, M. L.: **The function of the nuclear matrix attachment region of silkworm rDNA as an autonomously replicating sequence in plasmid and chromosomal replication origin in yeast.** Biochem Biophys Res Commun (2002) 299 (5): 723-9.

Chen, Z. Y., He, C. Y., Ehrhardt, A., Kay, M. A.: **Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo.** Mol Ther (2003) 8 (3): 495-500.

Chen, Z. Y., He, C. Y., Meuse, L., Kay, M. A.: **Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo.** Gene Ther (2004) 11 (10): 856-64.

Chen, Z. Y., He, C. Y., Kay, M. A.: **Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo.** Hum Gene Ther (2005) 16 (1): 126-31.

Chen, Z. Y., Riu, E., He, C. Y., Xu, H., Kay, M. A.: **Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation.** Mol Ther (2008) 16 (3): 548-56.

Chiu, N. H., Christopoulos, T. K.: **Two-site expression immunoassay using a firefly luciferase-coding DNA label.** Clin Chem (1999) 45 (11): 1954-9.

Cho, M. S., Yee, H., Brown, C., Mei, B., Mirenda, C., Chan, S.: **Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins.** Biotechnol Prog (2003) 19 (1): 229-32.

Chomet, P. S.: **Cytosine methylation in gene-silencing mechanisms.** Curr Opin Cell Biol (1991) 3 (3): 438-43.

Chung, J. H., Whiteley, M., Felsenfeld, G.: **A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effects in Drosophila.** Cell (1993) 74 (3): 505-14.

Cockerill, P. N., Garrard, W. T.: **Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites.** Cell (1986a) 44 (2): 273-82.

Cockerill, P. N., Garrard, W. T.: **Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved.** FEBS Lett (1986b) 204 (1): 5-7.

Cockerill, P. N., Yuen, M. H., Garrard, W. T.: **The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements.** J Biol Chem (1987) 262 (11): 5394-7.

Cole, A.: **Child in gene therapy programme develops leukaemia.** BMJ (2008) 336 (7634): 13.

Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C., Kost, T. A.: **Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector.** Proc Natl Acad Sci U S A (1999) 96 (1): 127-32.

Contag, C. H., Spilman, S. D., Contag, P. R., Oshiro, M., Eames, B., Dennerly, P., Stevenson, D. K., Benaron, D. A.: **Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter.** Photochem Photobiol (1997) 66 (4): 523-31.

Cooper, M. J., Lipka, M., Payne, J. M., Hatzivassiliou, G., Reifenberg, E., Fayazi, B., Perales, J. C., Morrison, L. J., Templeton, D., Piekarz, R. L., Tan, J.: **Safety-modified episomal vectors for human gene therapy.** Proc Natl Acad Sci U S A (1997) 94 (12): 6450-5.

Cvetič, C., Walter, J. C.: **Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific?** Semin Cell Dev Biol (2005) 16 (3): 343-53.

Darquet, A. M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., Crouzet, J.: **A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle.** Gene Ther (1997) 4 (12): 1341-9.

Darquet, A. M., Rangara, R., Kreiss, P., Schwartz, B., Naimi, S., Delaère, P., Crouzet, J., Scherman, D.: **Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer.** Gene Ther (1999) 6 (2): 209-18.

Davie, J. R.: **Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin.** Mol Biol Rep (1997) 24 (3): 197-207.

De Benedetti, A., Rhoads, R. E.: **A novel BK virus-based episomal vector for expression of foreign genes in mammalian cells.** Nucleic Acids Res (1991) 19 (8): 1925-31.

Demarchi, J. M.: **Human cytomegalovirus DNA: restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early, and late RNAs.** Virology (1981) 114 (1): 23-38.

Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos, R., Fiers, W.: **Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene.** Nature (1980) 285 (5766): 542-7.

deVilliers, J., Schaffner, W., Tyndall, C., Lupton, S., Kamen, R.: **Polyoma virus DNA replication requires an enhancer.** Nature (1984) 312 (5991): 242-6.

de Vries, E., van Driel, W., van den Heuvel, S. J., van der Vliet, P. C.: **Contactpoint analysis of the HeLa nuclear factor I recognition site reveals symmetrical binding at one site of the DNA helix.** EMBO J (1987) 6 (1): 161-8.

Diffley, J. F.: **Regulation of early events in chromosome replication.** Curr Biol (2004) 14 (18): R778-86.

Doerfler, W., Hoeveler, A., Weisshaar, B., Dobrzanski, P., Knebel, D., Langner, K. D., Achten, S., Müller, U.: **Promoter inactivation or inhibition by sequence-specific methylation and mechanisms of reactivation.** Cell Biophys (1989) 15 (1-2):21-7.

Doerfler, W.: **De novo methylation, long-term promoter silencing, methylation patterns in the human genome, and consequences of foreign DNA insertion.** Curr Top Microbiol Immunol (2006) 301: 125-75.

Durocher, Y., Perret, S., Kamen, A.: **High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells.** Nucleic Acids Res (2002) 30 (2): E9.

Dyson, P. J., Farrell, P. J.: **Chromatin structure of Epstein-Barr virus.** J Gen Virol (1985) 66 (Pt 9): 1931-40.

Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M., Liu, L. F.: **Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds.** J Cell Biol (1985) 100 (5): 1706-15.

Earnshaw, W. C., Heck, M. M.: **Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes.** J Cell Biol (1985) 100 (5): 1716-25.

Eastman, S. J., Siegel, C., Tousignant, J., Smith, A. E., Cheng, S. H., Scheule, R. K.: **Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes.** Biochim Biophys Acta (1997) 1325 (1): 41-62.

Ebeling, A., Keil, G., Nowak, B., Fleckenstein, B., Berthelot, N., Sheldrick, P.: **Genome structure and virion polypeptides of the primate herpesviruses Herpesvirus aotus types 1 and 3: comparison with human cytomegalovirus.** J Virol (1983) 45 (2): 715-26.

Ehrlich, M., Sarafyan, L. P., Myers, D. J.: **Interaction of microbial DNA with cultured mammalian cells. Binding of the donor DNA to the cell surface.** Biochim Biophys Acta (1976) 454 (3): 397-409.

Escriou, V., Ciolina, C., Helbling-Leclerc, A., Wils, P., Scherman, D.: **Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA.** Cell Biol Toxicol (1998) 14 (2): 95-104.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M.: **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** Proc Natl Acad Sci U S A (1987) 84 (21): 7413-7.

Finch, J. T., Klug, A.: **Solenoidal model for superstructure in chromatin.** Proc Natl Acad Sci U S A (1976) 73 (6): 1897-901.

Friedman, R. M.: **Antiviral activity of interferons.** Bacteriol Rev (1977) 41 (3): 543-67.

Friend, D. S., Papahadjopoulos, D., Debs, R. J.: **Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes.** Biochim Biophys Acta (1996) 1278 (1): 41-50.

Gao, X., Huang, L.: **A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells.** Biochem Biophys Res Commun (1991) 179 (1): 280-5.

Gao, X., Huang, L.: **Potential of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations.** Biochemistry (1996) 35 (3): 1027-36.

Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I., Whitelaw, E.: **Repeat-induced gene silencing in mammals.** Nat Genet (1998) 18 (1): 56-9.

Gasser, S. M., Laemmli, U. K.: **Cohabitation of scaffold binding regions with upstream / enhancer elements of three developmentally regulated genes of D. melanogaster.** Cell (1986) 46 (4): 521-30.

Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., Laemmli, U. K.: **Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II.** J Mol Biol (1986) 188 (4): 613-29.

Geisse, S., Jordan, M., Wurm, F. M.: **Large-scale transient expression of therapeutic proteins in mammalian cells.** Methods Mol Biol (2005) 308: 87-98.

Gill, N. K., Appleton, M., Baganz, F., Lye, G. J.: **Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up.** Biotechnol Bioeng (2008) 100 (6): 1144-55.

Girard, P., Derouazi, M., Baumgartner, G., Bourgeois, M., Jordan, M., Jacko, B., Wurm, F. M.: **100-liter transient transfection**. Cytotechnology (2002) 38 (1-3): 15-21.

Girod, P. A., Nguyen, D. Q., Calabrese, D., Puttini, S., Grandjean, M., Martinet, D., Regamey, A., Saugy, D., Beckmann, J. S., Bucher, P., Mermoud, N.: **Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells**. Nat Methods (2007) 4 (9): 747-53.

Glikin, G. C., Ruberti, I., Worcel, A.: **Chromatin assembly in Xenopus oocytes: in vitro studies**. Cell (1984) 37 (1): 33-41.

Goetze, S.: **Funktionsanalysen nicht-kodierender genomischer DNA-Bereiche unter Berücksichtigung biomathematischer Modelle**. Dissertation (2003) Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland.

Goetze, S., Gluch, A., Benham, C., Bode, J.: **Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains**. Biochemistry (2003) 42 (1): 154-66.

Goetze, S., Baer, A., Winkelmann, S., Nehlsen, K., Seibler, J., Maass, K., Bode, J.: **Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci**. Mol Cell Biol (2005) 25 (6): 2260-72.

Goodsell, D. S., Kopka, M. L., Cascio, D., Dickerson, R. E.: **Crystal structure of CATGGCCATG and its implications for A-tract bending models**. Proc Natl Acad Sci U S A (1993) 90 (7): 2930-4.

Graham, F. L., van der Eb, A. J.: **A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA**. Virology (1973) 52 (2): 456-67.

Green, A. A., McElroy, W. D.: **Crystalline firefly luciferase**. Biochim Biophys Acta (1956) 20 (1): 170-6.

Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagaragan, B., Calos, M. P.: **A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells**. Proc Natl Acad Sci U S A (2000) 97 (11): 5995-6000.

Grosjean, F., Batard, P., Jordan, M., Wurm, F. M.: **S-phase synchronized CHO cells show elevated transfection efficiency and expression using CaPi.** Cytotechnology (2002) 38 (1-3): 57-62.

Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J.: **Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.** J Bacteriol (1995) 177 (14): 4121-30.

Haase, S. B., Heinzl, S. S., Krysan, P. J., Calos, M. P.: **Improved EBV shuttle vectors.** Mutat Res (1989) 220 (2-3): 125-32.

Haase, R., Argyros, O., Wong, S. P., Harbottle, R. P., Lipps, H. J., Ogris, M., Magnusson, T., Vizoso Pinto, M. G., Haas, J., Baiker, A.: **pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells.** BMC Biotechnol (2010) 10:20.

Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A.: **A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency.** N Engl J Med (2003) 348 (3): 255-6.

Hackett, C. S., Geurts, A. M., Hackett, P. B.: **Predicting preferential DNA vector insertion sites: implications for functional genomics and gene therapy.** Genome Biol (2007) 8 Suppl 1: S12.

Hahn, K.: **Optimierung der Etablierungsmechanismen nicht-viraler episomal replizierender Vektorsysteme.** Bachelorarbeit (2008) Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland.

Han, S., Udvardy, A., Schedl, P.: **Novobiocin blocks the Drosophila heat shock response.** J Mol Biol (1985) 183 (1): 13-29.

Hansen, W.: **Glykodesign und Herstellung sicherer Verpackungszelllinien zur Erzeugung rekombinanter, serumstabiler Retroviren für die Gentherapie.** Dissertation (2001) Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland.

Hanson, R. D., Ley, T. J. **A-T-rich scaffold attachment regions flank the hematopoietic serine protease genes clustered on chromosome 14q11.2.** Blood (1992) 79 (3): 610-8.

Hayashi, K., Hofstaetter, T., Yakuwa, N.: **Asymmetry of chromatin subunits probed with histone H1 in an H1-DNA complex.** Biochemistry (1978) 16; 17 (10): 1880-3.

Hennighausen, L., Fleckenstein, B.: **Nuclear factor 1 interacts with five DNA elements in the promoter region of the human cytomegalovirus major immediate early gene.** EMBO J (1986) 5 (6): 1367-71.

Hiscott, J., Alper, D., Cohen, L., Leblanc, J. F., Sportza, L., Wong, A., Xanthoudakis, S.: **Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer.** J Virol (1989) 63 (6): 2557-66.

Hodges, B. L., Taylor, K. M., Joseph, M. F., Bourgeois, S. A., Scheule, R. K.: **Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides.** Mol Ther (2004) 10 (2): 269-78.

Hoekstra, D., Rejman, J., Wasungu, L., Shi, F., Zuhorn, I.: **Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome.** Biochem Soc Trans (2007) 35 (Pt 1): 68-71.

Hoess, R. H., Abremski, K.: **Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system.** J Mol Biol (1985) 181 (3): 351-62.

Holm, C., Goto, T., Wang, J. C., Botstein, D.: **DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast.** Cell (1985) 41 (2): 553-63.

Homberger, H. P.: **Bent DNA is a structural feature of scaffold-attached regions in Drosophila melanogaster interphase nuclei.** Chromosoma (1989) 98 (2): 99-104.

Huberman, J. A., Zhu, J. G., Davis, L. R., Newlon, C. S.: **Close association of a DNA replication origin and an ARS element on chromosome III of the yeast, Saccharomyces cerevisiae.** Nucleic Acids Res (1988) 16 (14A): 6373-84.

Hyde-DeRuyscher, R. P., Jennings, E., Shenk, T.: **DNA binding sites for the transcriptional activator / repressor YY1.** Nucleic Acids Res (1995) 23 (21): 4457-65.

International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC): **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** Nature (2004) 431 (7011): 931-45.

Invitrogen *life technologies*: **Tightly controlled bacterial protein expression; pBAD expression system.**

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/710_01619_pBAD_bro.pdf

Jackson, D. A., Cook, P. R.: **Transcription occurs at a nucleoskeleton.** EMBO J (1985) 4 (4): 919-25.

Jain, R. K.: **Transport of molecules in the tumor interstitium: a review.** Cancer Res (1987) 47 (12): 3039-51.

Jenke, B. H., Fetzer, C. P., Stehle, I. M., Jönsson, F., Fackelmayer, F. O., Conradt, H., Bode, J., Lipps, H. J.: **An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo.** EMBO Rep (2002) 3 (4): 349-54.

Jenke, A. C., Stehle, I. M., Herrmann, F., Eisenberger, T., Baiker, A., Bode, J., Fackelmayer, F. O., Lipps, H. J.: **Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome.** Proc Natl Acad Sci U S A (2004) 101 (31): 11322-7.

Jenkins, N., Murphy, L., Tyther, R.: **Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals.** Mol Biotechnol (2008) 39 (2): 113-8.

Kamata, T., Tanaka, S., Watanabe, Y.: **Human cytomegalovirus-induced chromatin factors responsible for changes in template activity and structure of infected cell chromatin.** Virology (1978) 90 (2): 197-208.

Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., Harashima, H.: **Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery.** Pharmacol Rev (2006) 58 (1): 32-45.

Kim, T. K., Eberwine, J. H.: **Mammalian cell transfection: the present and the future.** Anal Bioanal Chem (2010) 397 (8): 3173-8.

Kipp, M., Göhring, F., Ostendorp, T., van Drunen, C. M., van Driel, R., Przybylski, M., Fackelmayer, F. O.: **SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA.** Mol Cell Biol (2000) 20 (20): 7480-9.

Kirinaka, H., Kamihira, M., Iijima, S., Kobayashi, T.: **A new runaway type episomal vector for mammalian cells based on a temperature-sensitive simian virus 40 and inducible erythropoietin production.** Appl Microbiol Biotechnol (1994) 41 (5): 591-6.

Klar, M., Stellamanns, E., Ak, P., Gluch, A., Bode, J.: **Dominant genomic structures: detection and potential signal functions in the interferon-beta domain.** Gene (2005) 364: 79-89.

Klar, M., Bode, J.: **Enhanceosome formation over the beta interferon promoter underlies a remote-control mechanism mediated by YY1 and YY2.** Mol Cell Biol (2005) 25 (22): 10159-70.

Klehr, D., Maass, K., Bode, J.: **Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters.** Biochemistry (1991) 30 (5): 1264-70.

Klinman, D. M., Yamshchikov, G., Ishigatsubo, Y.: **Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines.** J Immunol (1997) 158 (8): 3635-9.

Kohn, D. B., Sadelain, M., Glorioso, J. C.: **Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID.** Nat Rev Cancer (2003) 3 (7): 477-88.

Kohwi-Shigematsu, T., Kohwi, Y.: **Torsional stress stabilizes extended base unpairing in suppressor sites flanking immunoglobulin heavy chain enhancer.** Biochemistry (1990) 29 (41): 9551-60.

Kornberg, R. D.: **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.** Science (1974) 184 (139): 868-71.

Kornberg, R. D.: **Structure of chromatin.** Annu Rev Biochem (1977) 46: 931-54.

Kreiss, P., Cameron, B., Darquet, A. M., Scherman, D., Crouzet, J.: **Production of a new DNA vehicle for gene transfer using site-specific recombination.** Appl Microbiol Biotechnol (1998) 49 (5): 560-7.

Krysan, P. J., Haase, S. B., Calos, M. P.: **Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells.** Mol Cell Biol (1989) 9 (3): 1026-33.

Law, M. F., Lowy, D. R., Dvoretzky, I., Howley, P. M.: **Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences.** Proc Natl Acad Sci U S A (1981) 78 (5): 2727-31.

Leclerc, P. G., Panjwani, A., Docherty, R., Berry, M., Pizzey, J., Tonge, D. A.: **Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation.** J Neurosci Methods (2005) 142 (1): 137-43.

Lee, E. C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D. A., Court, D. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G.: **A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA.** Genomics (2001) 73 (1): 56-65.

Lembert, N., Idahl, L. A.: **Regulatory effects of ATP and luciferin on firefly luciferase activity.** Biochem J (1995) 305 (Pt 3): 929-33.

Lewis, C. D., Laemmli, U. K.: **Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions.** Cell (1982) 29 (1): 171-81.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C., Kain, S. R.: **Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter.** J Biol Chem (1998) 273 (52): 34970-5.

Lipps, H. J., Jenke, A. C., Nehlsen, K., Scinteie, M. F., Stehle, I. M., Bode, J.: **Chromosome-based vectors for gene therapy.** Gene (2003) 304: 23-33.

Liu, R., Baillie, J., Sissons, J. G., Sinclair, J. H.: **The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells.** Nucleic Acids Res (1994) 22 (13): 2453-9.

Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J. M., Chiou, H. C.: **Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells.** Mol Biotechnol (2008) 39 (2): 141-53.

Lobell, R. B., Schleif, R. F.: **DNA looping and unlooping by AraC protein.** Science (1990) 250 (4980): 528-32.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.: **Molecular Cell Biology**. W. H. Freeman and Company New York England, Fourth Edition, 2001.

López, C. M., Rhol, D. A., Trunck, L. A., Schweizer, H. P.: **Versatile dual-technology system for markerless allele replacement in Burkholderia pseudomallei**. Appl Environ Microbiol (2009) 75 (20): 6496-503.

Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M., Cormier, M. J.: **Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase**. Proc Natl Acad Sci U S A (1991) 88 (10): 4438-42.

Lorenz, W. W., Cormier, M. J., O'Kane, D. J., Hua, D., Escher, A. A., Szalay, A. A.: **Expression of the Renilla reniformis luciferase gene in mammalian cells**. J Biolumin Chemilumin (1996) 11 (1): 31-7.

Löser, P., Jennings, G. S., Strauss, M., Sandig, V.: **Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFκB**. J Virol (1998) 72 (1): 180-90.

Ludérus, M. E., den Blaauwen, J. L., de Smit, O. J., Compton, D. A., van Driel, R.: **Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove**. Mol Cell Biol (1994) 14 (9): 6297-305.

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J.: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution**. Nature (1997) 389 (6648): 251-60.

Lupton, S., Levine, A. J.: **Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells**. Mol Cell Biol (1985) 5 (10): 2533-42.

Mariati, Ng, Y., K., Chao, S. H., Yap, M. G., Yang, Y.: **Evaluating regulatory elements of human cytomegalovirus major immediate early gene for enhancing transgene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells**. J Biotechnol (2010) 147 (3-4): 160-3.

Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W., Howe, J. R., Hughes, T. E.: **The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function**. Neuron (1995) 14 (2): 211-5.

Marshall, E.: **Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia.** Science (2003) 299 (5605): 320.

Martinet, W., Schrijvers, D. M., Kockx, M. M.: **Nucleofection as an efficient nonviral method for human monocytic cells.** Biotechnol Lett (2003) 25 (13): 1025-9.

Matthews, J. C., Hori, K., Cormier, M. J.: **Purification and properties of Renilla reniformis luciferase.** Biochemistry (1977) 16 (1): 85-91.

Mayrhofer, P., Blaesens, M., Schleef, M., Jechlinger, W.: **Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography.** J Gene Med (2008) 10 (11): 1253-69.

Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., Bode, J.: **Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties in vitro and function in vivo.** Biochemistry (1990) 29 (32): 7475-85.

Mirkovitch, J., Gasser, S. M., Laemmli, U. K. **Relation of chromosome structure and gene expression.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (1987) 317 (1187): 563-74.

Miyada, C. G., Stoltzfus, L., Wilcox, G.: **Regulation of the araC gene of Escherichia coli: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression.** Proc Natl Acad Sci U S A (1984) 81 (13): 4120-4.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol (1986) 51 Pt. 1: 263-73.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A.: **Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination.** Nature (1992) 360 (6404): 597-9.

Murray, K.: **The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones.** Biochemistry (1964) 3: 10-5.

Namciu, S. J., Blochlinger, K. B., Fournier, R. E.: **Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster***. Mol Cell Biol (1998) 18 (4): 2382-91.

Nardozza, T. A., Quigley, M. M., Getzenberg, R. H.: **Association of transcription factors with the nuclear matrix**. J Cell Biochem (1996) 61 (3): 467-77.

Naylor, L. H., Yee, H. A., van de Sande, J. H.: **Length-dependent cruciform extrusion in d(GTAC)_n sequences**. J Biomol Struct Dyn (1988) 5 (4): 895-912.

Nehlsen, K., Broll, S., Bode, J.: **Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells**. Gene Ther Mol Biol (2006) 10: 233-244.

Nehlsen, K., Broll, B., Kandimalla, R., Heinz, N., Heine, M., Binius, S., Schambach, A., Bode, J.: **Replicating minicircles: Overcoming the limitations of transient and of stable expression systems**. In "Minicircle and Plasmid DNA Vectors The Future of non-viral and viral Gene-Transfer", Schleef (Ed.) Wiley-VCH Verlag, in Druck.

Nelson, D., Cox, M.: **Lehninger Biochemie**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3. Auflage, 2001.

Nelson, H. C., Finch, J. T., Luisi, B. F., Klug, A.: **The structure of an oligo(dA).oligo(dT) tract and its biological implications**. Nature (1987) 330 (6145): 221-6.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H.: **Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields**. EMBO J (1982) 1 (7): 841-5.

Nickerson, J. A., Blencowe, B. J., Penman, S.: **The architectural organization of nuclear metabolism**. Int Rev Cytol (1995) 162A: 67-123.

Nightingale, K. P.: **Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila hsp26* gene in chromatin**. EMBO J (1998) 17 (10): 2865-76.

NIH Report 2002: **Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee**. Hum Gene Ther (2002) 13 (1): 3-13.

Nishitani, H., Lygerou, Z.: **Control of DNA replication licensing in a cell cycle.** Genes Cells (2002) 7 (6): 523-34.

Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P., Bradbury, E. M.: **Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change.** Cell (1989) 57 (3): 449-57.

Nowock, J., Borgmeyer, U., Püschel, A. W., Rupp, R. A., Sippel, A. E.: **The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer.** Nucleic Acids Res (1985) 13 (6): 2045-61.

Ochiai, H., Harashima, H., Kamiya, H.: **Silencing of exogenous DNA in cultured cells.** Biol Pharm Bull (2006) 29 (6): 1294-6.

Ogden, S., Haggerty, D., Stoner, C. M., Kolodrubetz, D., Schleif, R.: **The Escherichia coli L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation.** Proc Natl Acad Sci U S A (1980) 77 (6): 3346-50.

Osten, P., Grinevich, V., Cetin, A.: **Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service.** Handb Exp Pharmacol (2007) (178): 177-202.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., Chambon, P.: **Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit.** Cell (1975) 4 (4): 281-300.

Oumard, A., Qiao, J., Jostock, T., Li, J., Bode, J.: **Recommended method for chromosome exploitation: RMCE-based cassette-exchange systems in animal cell biotechnology.** Cytotechnology (2006) 50 (1-3): 93-108.

Palazzoli, F., Carnus, E., Wells, D. J., Bigot, Y.: **Sustained transgene expression using non-viral enzymatic systems for stable chromosomal integration.** Curr Gene Ther (2008) 8 (5): 367-90.

Panyutin, I., Lyamichev, V., Mirkin, S.: **A structural transition in d(AT)_n.d(AT)_n inserts within superhelical DNA.** J Biomol Struct Dyn (1985) 2 (6): 1221-34.

Paulson, J. R., Laemmli, U. K.: **The structure of histone-depleted metaphase chromosomes.** Cell (1977) 12 (3): 817-28.

Peterson, C. L., Laniel, M. A.: **Histones and histone modifications.** Curr Biol (2004) 14 (14): R546-51.

Pham, P. L., Perret, S., Doan, H. C., Cass, B., St-Laurent, G., Kamen, A., Durocher, Y.: **Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency.** Biotechnol Bioeng (2003) 84 (3): 332-42.

Pham, P. L., Kamen, A., Durocher, Y.: **Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein.** Mol Biotechnol (2006) 34 (2): 225-37.

Phillips, D. M.: **The presence of acetyl groups of histones.** Biochem J (1963) 87: 258-63.

Phi-Van, L., von Kries, J. P., Ostertag, W., Strätling, W. H.: **The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes.** Mol Cell Biol (1990) 10 (5): 2302-7.

Phi-Van, L., Strätling, W. H.: **Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate expression and to dampen position effects.** Biochemistry (1996) 35 (33): 10735-42.

Piechaczek, C., Fetzner, C., Baiker, A., Bode, J., Lipps, H. J.: **A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells.** Nucleic Acids Res (1999) 27 (2): 426-8.

Pina, B., Brüggemeier, U., Beato, M.: **Nucleosome positioning modulated accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter.** Cell (1990) 60 (5): 719-31.

Pollard, H., Remy, J. S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J. P., Escande, D.: **Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells.** J Biol Chem (1998) 273 (13): 7507-11.

Potter, H., Weir, L., Leder, P.: **Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.** Proc Natl Acad Sci U S A (1984) 81 (22): 7161-5.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J.: **Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein.** Gene (1992) 111 (2): 229-33.

Qiao, J.: **Systematic study on generation of mammalian production cell lines by targeted integration (RMCE).** Dissertation (2009) Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland.

Qiao, J., Oumard, A., Wegloehner, W., Bode, J.: **Novel tag-and-exchange (RMCE) strategies generate master cell clones with predictable and stable transgene expression properties.** J Mol Biol (2009) 390 (4): 579-94.

Raymond, C. S., Soriano, P.: **High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells.** PLoS One (2007) 2 (1): e162.

Recillas-Targa, F., Pikaart, M. J., Burgess-Beusse, B., Bell, A. C., Litt, M. D., West, A. G., Gaszner, M., Felsenfeld, G.: **Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities.** Proc Natl Acad Sci U S A (2002) 99 (10): 6883-8.

Richards, E. J., Elgin, S. C.: **Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects.** Cell (2002) 108 (4): 489-500.

Ritzén, U., Rotticci-Mulder, J., Strömberg, P., Schmidt, S. R.: **Endotoxin reduction in monoclonal antibody preparations using arginine.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2007) 856 (1-2): 343-7.

Riu, E., Grimm, D., Huang, Z., Kay, M. A.: **Increased maintenance and persistence of transgenes by excision of expression cassettes from plasmid sequences in vivo.** Hum Gene Ther (2005) 16 (5): 558-70.

Robbins, P. D., Ghivizzani, S. C.: **Viral vectors for gene therapy.** Pharmacol Ther (1998) 80 (1): 35-47.

Roberge, M., Dahmus, M. E., Bradbury, E. M.: **Chromosomal loop/nuclear matrix organization of transcriptionally active and inactive RNA polymerases in HeLa nuclei.** J Mol Biol (1988) 201 (3): 545-55.

Romano, G., Marino, I. R., Pentimalli, F., Adamo, V., Giordano, A.: **Insertional mutagenesis and development of malignancies induced by integrating gene delivery systems: implications for the design of safer gene-based interventions in patients.** Drug News Perspect (2009) 22 (4): 185-96.

Romig, H., Fackelmayer, F. O., Renz, A., Ramsperger, U., Richter, A.: **Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix / scaffold attachment DNA elements.** EMBO J (1992) 11 (9): 3431-40.

Rosenberg-Hasson, Y., Bercovich, Z., Ciechanover, A., Kahana, C.: **Degradation of ornithine decarboxylase in mammalian cells is ATP dependent but ubiquitin independent.** Eur J Biochem (1989) 185 (2): 469-74.

Ross, P. C., Hui, S. W.: **Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency.** Gene Ther (1999) 6 (4): 651-9.

Rubnitz, J., Subramani, S.: **Rapid assay for extrachromosomal homologous recombination in monkey cells.** Mol Cell Biol (1985) 5 (3): 529-37.

Ryoji, M., Worcel, A.: **Chromatin assembly in Xenopus oocytes: in vivo studies.** Cell (1984) 37 (1): 21-32.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schart, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** Science (1988) 239 (4839): 487-91.

Sander, M., Hsieh, T. S.: **Drosophila topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site.** Nucleic Acids Res (1985) 13 (4): 1057-72.

Sander, M., Hsieh, T., Udvardy, A., Schedl, P.: **Sequence dependence of Drosophila topoisomerase II in plasmid relaxation and DNA binding.** J Mol Biol (1987) 194 (2): 219-29.

Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I. M., Lipps, H. J., Knippers, R.: **An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex.** EMBO J (2004) 23 (1): 191-201.

Schlaeger, E. J., Christensen, K.: **Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture.** Cytotechnology (1999) 30 (1-3): 71-83.

Schlake, T., Bode, J.: **Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci.** Biochemistry (1994) 33 (43): 12746-51.

Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Barnett, S., Capecchi, M. R.: **Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids.** Proc Natl Acad Sci U S A (2000) 97 (25): 13702-7.

Schübeler, D., Mielke, C., Maass, K., Bode, J.: **Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner.** Biochemistry (1996) 35 (34): 11160-9.

Schübeler, D., Maass, K., Bode, J.: **Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences.** Biochemistry (1998) 37 (34): 11907-14.

Sells, M. A., Li, J., Chernoff, J.: **Delivery of protein into cells using polycationic liposomes.** Biotechniques (1995) 19 (1): 72-6, 78.

Seow, Y., Wood, M. J.: **Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors.** Mol Ther (2009) 17 (5): 767-77.

Shabalina, S. A., Ogurtsov, A. Y., Spiridonov, N. A.: **A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code.** Nucleic Acids Res (2006) 34 (8): 2428-37.

Shaw, B. R., Herman, T. M., Kovacic, R. T., Beaudreau, G. S., Van Holde, K. E.: **Analysis of subunit organization in chicken erythrocyte chromatin.** Proc Natl Acad Sci U S A (1976) 73 (2): 505-9.

Shi, Y., Lee, J. S., Galvin, K. M.: **Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1** Biochem Biophys Acta (1997) 1332 (2): F49-66.

Singh, G. B., Kramer, J. A., Krawetz, S. A.: **Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix.** Nucleic Acids Res (1997) 25 (1): 1419-25.

Sitton, G., Hansgate, A., Srienc, F.: **Transient gene expression in CHO cells monitored with automated flow cytometry.** Cytotechnology (2006) 52 (1): 13-24.

Smith, H. C., Berezney, R.: **DNA polymerase alpha is tightly bound to the nuclear matrix of actively replicating liver.** Biochem Biophys Res Commun (1980) 97 (4): 1541-7.

Soisson, S. M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R., Wolberger, C.: **Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC.** Science (1997) 276 (5311): 421-5.

Stehle, I. M., Scintie, M. F., Baiker, A., Jenke, A. C., Lipps, H. J.: **Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication.** Chromosome Res (2003) 11 (5): 413-21.

Stein, L. D.: **Human genome: end of the beginning.** Nature (2004) 431 (7011): 915-6.

Stenberg, R. M., Thomsen, D. R., Stinski, M. F.: **Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus.** J Virol (1984) 49 (1): 190-9.

Stief, A., Winter, D. M., Strätling, W. H., Sippel, A. E.: **A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity.** Nature (1989) 341 (6240): 343-5.

Stinski, M. F., Thomsen, D. R., Stenberg, R. M., Goldstein, L. C.: **Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus.** J Virol (1983) 46 (1): 1-14.

Tachibana, R., Harashima, H., Die, N., Ukitsu, S., Ohta, Y., Suzuki, N., Kikuchi, H., Shinohara, Y., Kiwada, H.: **Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes.** Pharm Res (2002) 19 (4): 377-81.

Tannous, B. A., Kim, D. E., Fernandez, J. L., Weissleder, R., Breakefield, X. O.: **Codon-optimized Gaussia Luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo.** Mol Ther (2005) 11 (3): 435-43.

The Journal of Gene Medicine: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

Thoma, F., Koller, T., Klug, A.: **Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.** J Cell Biol (1979) 83 (2 Pt 1): 403-27.

Thomas, M. J., Seto, E.: **Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?** Gene (1999) 236 (2): 197-208.

Thorpe, H. M., Smith, M. C.: **In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family.** Proc Natl Acad Sci U S A (1998) 95 (10): 5505-10.

Thyagarajan, B., Guimarães, M. J., Groth, A. C., Calos, M. P.: **Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites.** Gene (2000) 244 (1-2): 47-54.

Tolmachov, O. E.: **Tightly-wound miniknot vectors for gene therapy: a potential improvement over supercoiled minicircle DNA.** Med Hypotheses (2010) 74 (4): 702-4.

Tolosa, L., Kostov, Y., Harms, P., Rao, G.: **Noninvasive measurement of dissolved oxygen in shake flasks.** Biotechnol Bioeng (2002) 80 (5): 594-7.

Trent, J. M., Olson, S., Lawn, R. M.: **Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization.** Proc Natl Acad Sci U S A (1982) 79 (24): 7809-13.

Trompeter, H. I., Weinhold, S., Thiel, C., Wernet, P., Uhrberg, M.: **Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection.** J Immunol Methods (2003) 274 (1-2): 245-56.

Turan, S., Kuehle, J., Schambach, A., Baum, C., Bode, J.: **Multiplexing RMCE: versatile extensions of the Flp-recombinase-mediated cassette-exchange technology.** J Mol Biol (2010) 402 (1): 52-69.

Turan, S., Galla, M., Ernst, E., Qiao, J., Voelkel, C., Schiedlmeier, B., Zehe, C., Bode, J.: **Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): Traditional concepts and current challenges.** J Mol Biol (2011) 407 (2): 193-221.

Udvardy, A., Schedl, P., Sander, M., Hsieh, T. S.: **Topoisomerase II cleavage in chromatin.** J Mol Biol (1986) 191 (2): 231-46.

van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P., Haegeman, G.: **Episomal vectors for gene expression in mammalian cells.** Eur J Biochem (2000) 267 (18): 5665-78.

Varshavsky, A. J., Bakayev, V. V., Georgiev, G. P.: **Heterogeneity of chromatin subunits in vitro and location of histone H1.** Nucleic Acids Res (1976) 3 (2): 477-92.

Verhaegent, M., Christopoulos, T. K.: **Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization.** Anal Chem (2002) 74 (17): 4378-85.

Villeponteau, B., Lundell, M., Martinson, H.: **Torsional stress promotes the DNAase I sensitivity of active genes.** Cell (1984) 39 (3 Pt 2): 469-78.

von Kries, J. P., Buhrmester, H., Strätling, W. H.: **A matrix / scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding.** Cell (1991) 64 (1): 123-35.

Walther, W., Stein, U.: **Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases.** Drugs (2000) 60 (2): 249-71.

Wang, G., Guo, X., Floros, J.: **Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005) 289 (3): L497-508.

Wathen, M. W., Stinski, M. F.: **Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early and late times after infection.** J Virol (1982) 41 (2): 462-77.

Weill, L., Shestakova, E., Bonnefoy, E.: **Transcription factor YY1 binds to the murine beta interferon promoter and regulates its transcriptional capacity with a dual activator/repressor role.** J Virol (2003) 77 (5): 2903-14.

Weintraub, H., Van Lente, F.: **Dissection of chromosome structure with trypsin and nucleases.** Proc Natl Acad Sci U S A (1974) 71 (10): 4249-53.

Weintraub, H., Cheng, P. F., Conrad, K.: **Expression of transfected DNA depends on DNA topology.** Cell (1986) 46 (1): 115-22.

Westrate, M. W., Geelen, J. L., van der Nordaa, J.: **Human cytomegalovirus DNA: physical maps for restriction endonucleases BglII, HindIII and XbaI.** J Gen Virol (1980) 49 (1): 1-21.

Wong, S. P., Argyros, O., Coutelle, C., Harbottle, R. P.: **Non-viral S/MAR vectors replicate episomally in vivo when provided with a selective advantage.** Gene Ther (2011) 18 (1): 82-7.

Wurm, F., Bernard, A.: **Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production.** Curr Opin Biotechnol (1999) 10 (2): 156-9.

Wurm, F. M.: **Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.** Nat Biotechnol (2004) 22 (11): 1393-8.

Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N. Jr.: **The molecular structure of green fluorescent protein.** Nat Biotechnol (1996) 14 (10): 1246-51.

Yoon, C. S., Jung, H. S., Kwon, M. J., Lee, S. H., Kim, C. W., Kim, M. K., Lee, M., Park, J. H.: **Sonoporation of the minicircle-VEGF(165) for wound healing of diabetic mice.** Pharm Res (2009) 26 (4): 794-801.

Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., Welsh, M. J.: **Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid.** J Biol Chem (1995) 270 (32): 18997-9007.

Zhabinskaya, D., Benham, C. J.: **Theoretical analysis of the stress induced B-Z transition in superhelical DNA.** PLoS Comput Biol (2011) 7 (1): e1001051.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R.: **An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells.** Biochem Biophys Res Commun (1996) 227 (3): 707-11.

Zhao, M., Li, B., Zhao, H., He, M., Li, Z.: **Identification and characterization of scaffold-associated region (SAR) of rRNA of silkworm Attacus ricini.** Sci China C Life Sci (1998) 41 (2): 181-8.

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Epigenetische Regulationsmechanismen des Bereichs Molekulare Biotechnologie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung angefertigt. Das Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode danke ich ganz herzlich für die fachliche und persönliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, für die Diskussionen und Mühen, für die Begeisterung und durchgehende Motivation und für das stets offene Ohr bei all meinen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel danke ich für die Unterstützung und die Übernahme des Zweitgutachtens sowie dafür, dass er zusammen mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode die Arbeit vor der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Braunschweig vertritt. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Manfred Wirth danke ich für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas dieser Dissertation und des CMV-S/MAR-Elements. Darüber hinaus danke ich den Kooperationspartnern, Prof. Dr. An-Ping Zeng und Dr. Uwe Jandt von der Technischen Universität Hamburg-Harburg, sowie Dr. Shi Shao und Kathrin Goltz (HZI, Braunschweig) für die sehr gute Zusammenarbeit. Prof. Dr. Jürgen Bode, Dr. Manfred Wirth und Prof. Dr. An-Ping Zeng möchte ich außerdem für die Teilnahme am Thesis-Komitee danken.

Mein Dank gilt zudem der gesamten Arbeitsgruppe: Lijing Sun, Lucyna Lekawska, Sandra Broll, Sören Turan, Junhua Qiao, André Oumard, Astrid Hans und ganz besonders Markus Heine für die alltäglichen Diskussionen, die fachliche und persönliche Unterstützung sowie die vielen interessanten Gespräche. Den Kollegen des gesamten RDIF-Bereichs danke ich ebenfalls für die überaus lehrreiche Zeit.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie für jegliche Unterstützung während meiner Promotion: danke für alles.